

**PAPEL DE HEMO OXIGENASA-1 EN LA ARTRITIS INDUCIDA
POR TRANSFERENCIA DE SUERO K/BxN.
CARACTERIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL**



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA (Q*) Facultat de Farmàcia

Programa de doctorado en BIOMEDICINA Y FARMACIA

Dirigida por:

Dra. María José Alcaraz Tormo

Dra. María Luisa Ferrándiz Manglano

TESIS DOCTORAL

presentada por

Rita Brines Juan

Valencia, abril 2017



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

Facultat de Farmàcia

Programa de doctorado en BIOMEDICINA Y FARMACIA

**PAPEL DE HEMO OXIGENASA-1 EN LA ARTRITIS INDUCIDA
POR TRANSFERENCIA DE SUERO K/BxN. CARACTERIZACIÓN DEL
MODELO EXPERIMENTAL**

TESIS DOCTORAL

presentada por

Rita Brines Juan

Dirigida por:

Dra. María José Alcaraz Tormo

Dra. María Luisa Ferrándiz Manglano

Valencia, abril 2017



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Farmàcia

Departament de Farmacologia

Programa de doctorado en BIOMEDICINA Y FARMACIA

María José Alcaraz Tormo y María Luisa Ferrándiz Manglano, Catedráticas de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por la Licenciada Rita Brines Juan, titulado “Papel de hemo oxigenasa-1 en la artritis inducida por transferencia de suero K/BxN. Caracterización del modelo experimental” ha sido realizado en el Departament de Farmacologia de la Universitat de València, bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de esta Tesis Doctoral para que sea juzgada por el Tribunal correspondiente.

Valencia, 03 de abril de 2017

María José Alcaraz Tormo

María Luisa Ferrándiz Manglano

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por los siguientes proyectos y ayudas:

Proyecto SAF2010-22048 concedido por MINECO

"Estrategias de protección frente a los procesos degradativos osteoarticulares"

2011 - 2014

Proyecto SAF2013-4874R concedido por MINECO

"Mecanismos celulares reguladores de la respuesta inflamatoria en patologías inflamatorias crónicas"

2014 - 2017

Proyecto PROMETEO/2010/047 para grupos de investigación de excelencia, concedido por la Generalitat Valenciana:

"Mecanismos reguladores en procesos inflamatorios"

2010 - 2013

Proyecto PROMETEO/2010/047 para grupos de investigación de excelencia, concedido por la Generalitat Valenciana:

"Estrategias de protección frente a procesos inflamatorios y degenerativos"

2014 - 2017

El trabajo descrito en la presente Tesis se ha llevado a cabo en el Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, con un contrato predoctoral del Programa PROMETEO dentro del proyecto PROMETEO /2010/047. Algunos de los experimentos se realizaron en el Department of Medical Biotechnology, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Krakow, Poland.

Gracias a mi familia

A mis amigos y compañeros

A Javi

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AP	Proteína activadora
APC	Células presentadoras de antígenos
AR	Artritis reumatoide
ARE	Elementos de respuesta antioxidante
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
B ₀	Unión máxima
BSA	Albúmina de suero bovino
BVR	Biliverdina reductasa
CII	Colágeno tipo II
CIA	Artritis inducida por colágeno
COMP	Proteína oligomérica de la matriz extracelular del cartílago
CoPP	Cobalto-protoporfirina
CORMs	Moléculas liberadoras de CO
COX	Ciclooxigenasa
cpm	Cuentas por minuto
Ct	Ciclo umbral
CTLA	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen</i>
CXCL-1	<i>C-X-C motif chemokine ligand 1</i>
DAB	Diaminobencidina
DC	Células dendríticas
DHR	Dihidrorrodamina

Abreviaturas

DMEM	Medio Dulbecco modificado por Eagle
DMF	Dimetilformamida
dNTP	Desoxirribonucleótidos
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FARMEs	Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad
FCA	Adyuvante Completo de Freund
FcR	Receptor Fc
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GCL	Glutamato cisteína ligasa
GCs	Guanilato ciclasa soluble
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GPI	Glucosa-6-fosfato isomerasa
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación
GSR	Glutación reductasa
GSTA1	Glutación S-transferasa A1
³ H	Tritio
H/E	Tinción con hematoxilina de Gil y eosina acuosa
HEPES	Ácido N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-etanosulfónico]
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>

Abreviaturas

HLA-DRB1	Lugar estratégico del sistema HLA localizado en el <i>loci</i> DBR1
HMGB-1	<i>High mobility group box 1</i>
HO	Hemo oxigenasa
HRP	Peroxidasa de rábano
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IFN γ	Interferón gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
i.p.	Intraperitoneal
KO	<i>Knockout</i>
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
LTB $_4$	Leucotrieno B $_4$
MAP	<i>Mouse air pouch</i> (Bolsa de aire en ratón)
MAPK	Proteín cinasas activadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1 (CCL2)
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MGC	<i>Mouse genetics cologne</i>
MHC	Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad
MMPs	Metaloproteinasas de matriz
MPO	Mieloperoxidasa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato forma reducida
NF-E2	Factor nuclear eritroide 2
NF κ B	Factor nuclear kappa B
NK	Asesinas naturales o <i>natural killers</i>

Abreviaturas

NO	Óxido nítrico
NOD	<i>Non obese diabetic</i>
NQO1	NAD(P)H:quinona oxido-reductasa-1
Nrf2	Factor de transcripción 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2
NSB	Unión inespecífica
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OC	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
PAI	Inhibidor del activador de plasminógeno
PBS	Tampón fosfato salino
PGs	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PI3K	Fosfatidilinositol-3 cinasa
PKA	Proteín cinasa A
PKC	Proteín cinasa C
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PMNs	Polimorfonucleares
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
p.o.	Vía oral
PVDF	Polivinilideno difluoruro
r.p.m	Revoluciones por minuto
RANK	Receptor activador del factor nuclear kappa B
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B
RBEs	<i>Recombinase binding elements</i>

Abreviaturas

RIA	Radioinmunoensayo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT	Transcripción inversa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
SBF	Suero bovino fetal
s.c.	Subcutánea
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
SDS	Sodio dodecilsulfato
S.E.M.	Error estándar de la media
SF	Suero fisiológico
sMaf	Proteína Maf pequeña
SNC	Sistema nervioso central
SnPP	Estaño protoporfirina
SOD	Superóxido dismutasa
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TA	Actividad total
TCR	Receptor de células T
TGF β	Factor de crecimiento transformador beta
Th	Linfocitos T <i>helper</i>
Thxr	Tiorredoxina
Tm	Temperatura de fusión
TMB	Tetrametilbencidina
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAP	Fosfatasa ácida tartrato resistente
T reg	Linfocitos T reguladores
VCAM	Molécula de adhesión celular vascular

Abreviaturas

VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WT	<i>Wild type</i>

RESUMEN.....	25
1. INTRODUCCIÓN.....	31
1.1. ARTRITIS REUMATOIDE.....	33
1.1.1. Aspectos generales.....	33
1.1.2. Etiología.....	34
1.1.3. Fisiopatología.....	35
1.1.3.1. Inflamación de la membrana sinovial.....	36
1.1.3.2. Destrucción del cartílago.....	37
1.1.3.3. Erosión del hueso.....	37
1.1.3.4. Angiogénesis.....	38
1.1.4. Inmunopatogenia	39
1.1.4.1. El sistema inmunológico.....	39
1.1.4.2. Infiltración y activación celular.....	42
1.1.4.3. Citocinas y receptores de citocinas expresados en los tejidos de la articulación.....	44
1.1.5. Farmacoterapia de la AR.....	46
1.2. MODELOS ANIMALES DE ARTRITIS EXPERIMENTAL.....	47
1.2.1. Artritis inducida por colágeno (CIA).....	48
1.2.2. Modelo experimental de artritis inducida por transferencia de suero de ratones K/BxN.....	50
1.2.3. Otros modelos animales de AR.....	51
1.3. RATONES KNOCKOUT Y RATONES CONDICIONALES.....	53
1.3.1. Generación de ratones condicionales.....	54
1.3.2. Mecanismo de acción de la recombinasa Cre.....	54
1.4. VIA Nrf2/HO-1.....	57
1.4.1. Activación del factor de transcripción Nrf2.....	58
1.4.2. Regulación HO-1 vía Nrf2.....	61
1.4.3. Grupo hemo.....	61
1.4.4. Hemo oxigenasa	62
1.4.5. Efecto celular de los productos de la reacción de la HO	65
1.4.6. HO-1 en la AR.....	67
2. OBJETIVOS.....	69
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
3.1. MÉTODOS DE ESTUDIO IN VIVO.....	75
3.1.1. Animales utilizados en los modelos in vivo.....	75
3.1.2. Estudios en el modelo de artritis por transferencia de suero K/BxN.....	77
3.1.2.1. Material.....	77
3.1.2.2. Protocolo experimental clásico.....	77

Índice

3.1.2.3. Protocolo experimental modificado: resolución y cronificación del modelo.....	78
3.1.2.4. Obtención y procesamiento de las muestras.....	80
3.1.3. Modelo de inflamación aguda: Bolsa de aire en ratón.....	82
3.1.3.1. Material y animales.....	83
3.1.3.2. Protocolo experimental.....	84
3.1.3.3. Obtención y procesamiento de las muestras.....	85
3.1.4. Análisis de las muestras.....	85
3.1.4.1. Análisis histológico.....	85
a) Descalcificación de las muestras.....	85
b) Deshidratación de los tobillos.....	86
c) Inclusión en parafina, cortes, montaje y tinción de las muestras.....	87
d) Parámetros para la evaluación histológica de la articulación.....	89
3.1.4.2. Análisis inmunohistoquímico.....	91
3.1.4.3. Técnicas experimentales para la cuantificación de analitos en suero, pata o exudado de bolsa de aire.....	92
a) Determinación de proteínas por ELISA indirecto.....	92
b) Protocolo para la determinación de citocinas y otros mediadores (sistema de detección colorimétrico).....	93
c) Protocolo para la determinación de las citocinas TNF α e IL-1 β (sistema de detección fluorométrico).....	94
d) Determinación de eicosanoides por radioinmunoensayo (RIA).....	95
e) Inmunoensayo de mediadores por Multiplex de Luminex.....	97
f) Determinación de la actividad mieloperoxidasa.....	99
g) Determinación de proteínas por Western Blot.....	101
h) Análisis de la expresión génica por transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.....	104
3.2. MÉTODOS DE ESTUDIO EX VIVO.....	109
3.2.1. Aislamiento de células peritoneales.....	109
a) Obtención.....	109
b) Tinción de células por inmunofluorescencia.....	111
c) Caracterización de proteínas intracelulares y marcadores de membrana celular por citometría de flujo.....	111
3.2.2. Aislamiento de células de médula ósea de ratón.....	113
a) Obtención.....	113
b) Determinación de estrés oxidativo.....	114
c) Diferenciación de osteoclastos.....	114
d) Tinción de osteoclastos mediante la detección de TRAP-5b.....	115
3.3. ANALISIS ESTADÍSTICO.....	117
3.4. TAMPONES DE USO GENERAL, SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO CELULAR.....	119

4. RESULTADOS.....	121
4.1. ESTUDIO Y ADAPTACIÓN DEL MODELO DE ARTRITIS POR TRANSFERENCIA DE SUERO K/BxN.....	123
4.1.1. Variación de peso y puntuación macroscópica tras inducir la artritis.....	124
4.1.2. Niveles de mediadores inflamatorios en homogeneizado de pata de ratón....	128
4.1.3. Estrés oxidativo en células de médula ósea.....	130
4.1.4. Histología de tobillo en los grupos control, resolución y crónico del modelo artrítico K/BxN.....	131
4.1.5. Análisis inmunohistoquímico en sección articular de tobillo en ratones control, crónico y resolución.....	134
4.2. ESTUDIO DE LA DEFICIENCIA DE HO-1 EN LA ARTRITIS EXPERIMENTAL.....	136
4.2.1. ARTRITIS POR TRANSFERENCIA DE SUERO K/BxN EN RATONES HO-1 ^{-/-} , HO-1 ^{+/-} Y HO1 ^{+/+}	137
4.2.1.1. Incidencia, variación de peso y puntuación macroscópica tras inducir la artritis.....	137
4.2.1.2. Parámetros analizados en sangre.....	143
4.2.1.3. Niveles de citocinas y mediadores inflamatorios en suero.....	146
4.2.1.4. Niveles de mediadores inflamatorios en suero a diferentes tiempos del proceso artrítico.....	152
4.2.1.5. Niveles de mediadores inflamatorios en homogeneizado de pata trasera a día 10.....	154
4.2.1.6. Estudio histológico de tobillo en ratones artríticos HO-1 ^{-/-} , HO-1 ^{+/-} y HO-1 ^{+/+}	157
4.2.1.7. Análisis de la expresión de genes antioxidantes en los ratones artríticos.....	159
4.2.2. ESTUDIO EN RATONES HO-1 KNOCKOUT CONDICIONALES (HO-1 ^{KO-M}).....	160
4.2.2.1. Expresión de HO-1 en macrófagos peritoneales en ratones HO-1 ^{KO-M}	161
4.2.2.2. Resultados obtenidos en el modelo de bolsa de aire en ratones HO-1 ^{KO-M}	163
4.2.2.2.1. Estudio del modelo MAP en ratones C57BL/6 a distintos tiempos.....	164
4.2.2.2.2. Análisis de los efectos producidos por la carencia de HO-1 en las células de la línea mieloide en el modelo de MAP.....	167
4.2.2.3. Resultado del modelo de artritis experimental por transferencia de suero K/BxN en ratones HO-1 ^{KO-M}	170
4.2.2.3.1. Puntuación artrítica.....	171
4.2.2.3.2. Análisis por fluorescencia de la expresión de HO-1 en macrófagos peritoneales.....	173
4.2.2.3.3. Análisis de los mediadores inflamatorios analizados en homogeneizado de pata.....	174
4.2.2.3.4. Estudio del estrés oxidativo en células de médula ósea.....	179
4.2.2.3.5. Estudio histológico.....	179

Índice

4.2.2.3.6. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de HO-1.....	182
4.2.2.3.7. Diferenciación de células de médula ósea a osteoclastos.....	184
5. DISCUSIÓN.....	187
6. CONCLUSIONES.....	197
7. BIBLIOGRAFIA.....	201
8. ANEXOS.....	219
8.1. Artículos publicados durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.....	222
8.2. Informes del Comité Ético de Experimentación y Bienestar animal.....	223

Resumen

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica, crónica y de carácter autoinmune que produce daño articular en los pacientes. Cursa con la degradación del hueso subcondral y del cartílago articular causando un gran dolor; además de ser una enfermedad incapacitante, puede provocar síntomas extraarticulares que afecten a otros órganos.

El estudio de la patogenia y del tratamiento de la AR se desarrolla en gran medida sobre modelos animales de artritis experimental. En la actualidad existen varios modelos de artritis en ratón ampliamente utilizados como son el modelo de Artritis Inducida por Colágeno (CIA) y el modelo por transferencia de suero K/BxN. Aunque ambos son de gran utilidad, poseen algunas limitaciones. En el caso del modelo de CIA, produce un proceso artrítico muy llamativo en los ratones DBA1/J, sin embargo, no es tan reproducible en otras cepas de ratón como C57BL/6, que es la cepa más utilizada para ensayos de modificación genética. Por otro lado, el modelo de artritis por transferencia de suero K/BxN es muy útil en el estudio de la fase efectora de la AR, pero no permite analizar la fase más tardía de la enfermedad.

En la primera parte de esta tesis, se ha realizado un estudio para adaptar el modelo de artritis por transferencia de suero K/BxN a un modelo cronicado. Esto nos permite estudiar las características fisiopatológicas de este proceso en su fase más tardía en ratones *wild type* y en ratones modificados genéticamente, así como analizar distintas dianas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad.

La adaptación de este modelo se realizó ampliando el modelo inicial, consistente en dos inmunizaciones con suero proveniente de ratones espontáneamente artríticos, pasando a realizar cinco inmunizaciones periódicas. Con esto conseguimos mantener elevados los mediadores inflamatorios propios de dicha enfermedad y los signos característicos del proceso artrítico mimetizando la patogenia de la AR.

En la segunda parte de la tesis se estudia la participación de la enzima hemo oxigenasa-1 (HO-1) en la regulación de la AR. En estudios realizados previamente, analizamos la implicación del factor de transcripción Nrf2 que regula la expresión de esta enzima y que además codifica para una serie de genes con propiedades protectoras, antiinflamatorias y antioxidantes. Este factor de transcripción actúa en la patogénesis

Resumen

de la AR controlando y paliando el desarrollo y gravedad de la misma. La enzima HO-1 es una de las principales enzimas reguladas por Nrf2 y su función es catalizar la degradación oxidativa del grupo hemo, potencialmente tóxico. Además, productos de esta reacción como biliverdina, bilirrubina y monóxido de carbono (CO), pueden tener propiedades citoprotectoras, antioxidantes y antiinflamatorias. A la vista de estos resultados previos, decidimos centrar este estudio en el papel de HO-1 en la fase efectora de la artritis experimental.

Para ello, trabajamos con el modelo clásico de artritis experimental por transferencia de suero K/BxN. Los animales utilizados fueron ratones *Knockout (KO)* para la enzima HO-1 (HO-1^{-/-}), y ratones heterocigóticos (HO-1^{+/-}) que sí expresaban HO-1 pero únicamente en uno de sus alelos. En contra de la idea inicial, los ratones que mostraban mayor severidad en la patogenia de la artritis a nivel macroscópico fueron los ratones heterocigóticos y el estudio histológico confirmó estos datos. La heterocigosis provocó una intensa respuesta inflamatoria articular que estaría relacionada con un aumento de los niveles de CXCL-1 y de la migración leucocitaria, mientras que la homocigosis determinó una mayor respuesta inflamatoria sistémica.

Continuamos los estudios sobre la actividad de esta enzima en células mieloides. Para ello utilizamos ratones *KO* condicionales (HO-1^{KO-M}) incapaces de expresar HO-1 pero únicamente en las células de la línea mieloide. Para realizar un primer estudio de la implicación de HO-1 en el proceso inflamatorio mediado por dichas células, trabajamos con un modelo sencillo de inflamación aguda. El modelo utilizado es el conocido como “bolsa de aire en ratón” que está basado en la formación de una cavidad subcutánea en el dorso del animal tras la inyección de aire estéril. En la “bolsa” generada se pueden inyectar diferentes agentes irritantes que en nuestro caso, nos permiten estudiar la influencia de HO-1 en la producción de mediadores en el proceso inflamatorio.

En los resultados obtenidos, pudimos comprobar que los ratones HO-1^{KO-M} mostraban niveles más elevados de migración leucocitaria y de los mediadores inflamatorios principales (IL-1 β , TNF α , MMP-3, PGE₂).

Una vez comprobada la implicación de HO-1 mieloide en la regulación de un proceso inflamatorio agudo, estudiamos la influencia de esta delección en la línea mieloide en el

modelo de artritis por transferencia de suero K/BxN, donde la regulación de la inflamación depende de la influencia de una gran variedad de factores, ya que están implicados más mecanismos.

Con este objetivo, desarrollamos el modelo artrítico K/BxN en los ratones HO-1^{KO-M}. El resultado fue una artritis caracterizada por un aumento en la osteoclastogénesis y en la formación de osteofitos en los ratones HO-1^{KO-M}.

Introducción

1. Introducción

1.1 ARTRITIS REUMATOIDE

1.1.1 Aspectos generales

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria sistémica, con un alto componente autoinmune, caracterizada por provocar una inflamación persistente de las articulaciones. Como resultado se produce la destrucción progresiva del cartílago y hueso de la articulación, generando distintos grados de deformidad e incapacidad funcional (Roig, 2000); (Figura 1). En ocasiones, su comportamiento es extraarticular pudiendo afectar a diversos órganos y sistemas, como ojos, pulmones, corazón, piel, o vasos sanguíneos. Aunque la causa de la enfermedad sigue siendo desconocida, parece ser que la combinación entre la predisposición genética y los factores ambientales, es determinante en el desencadenamiento de esta patología, donde además, la autoinmunidad juega un papel primordial en la cronificación de la enfermedad y en la progresión de la misma.

Se diagnostica fundamentalmente por los signos y síntomas clínicos, así como con ciertos exámenes de laboratorio (como el factor reumatoide) y radiografía (Scott et al. 2010).

En pinturas anteriores al siglo XVIII ya se pueden apreciar representaciones de posibles enfermos de AR. Notable es el caso de la obra de Rubens, las tres Gracias, en la cual se aprecia la característica deformación que la artritis reumatoide produce en la mano de la "Gracia" de la izquierda (Figura 2) (Entezami et al. 2011).



Figura 1. La AR puede causar pérdida de la función articular y deformidad de los dedos (Roig 2000).

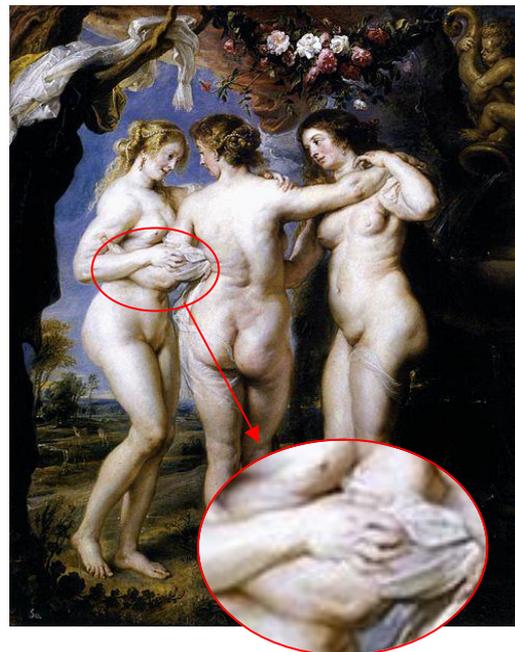


Figura 2. Las tres Gracias de Rubens (1636-1639). Se aprecia la típica deformidad de la AR en la mano de la Gracia situada a la izquierda (Entezami et al. 2011).

1. Introducción

En torno al 1% de la población mundial está afectada por la AR, siendo las mujeres tres veces más propensas a la enfermedad que los hombres (Firestein 2003). Su aparición es más frecuente entre los 35 y 50 años de edad, sin embargo, puede surgir a cualquier edad. Actualmente en España, aproximadamente 200.000 personas sufren AR, lo que supone un gran impacto personal, social y económico (Lajas et al. 2003). Según la Sociedad Española de Reumatología, la AR es la causa anual de un 5% de las bajas laborales de nuestro país, con un coste de 1.202 millones de euros, de los que 65.000 corresponden a gasto sanitario. Además, tiene un alto coste humano, ya que la pérdida de calidad de vida de los pacientes con AR es muy significativa, llegando a sufrir discapacidad grave en 10 años tras el primer brote de la enfermedad (Blumberg y Fox 2001)

La distribución de la enfermedad es mundial, no obstante hay poblaciones con mayor prevalencia, como los nativos americanos y zonas con menor gravedad, como el África subsahariana.

1.1.2 Etiología

Aunque existe una fuerte asociación entre ciertos genes y una mayor predisposición a desarrollar AR, la tasa de concordancia entre gemelos monocigóticos es sólo del 15%. Se asume que el **componente genético** determina en torno al 50% de la probabilidad de desarrollar AR mientras que el resto depende del **componente ambiental** (MacGregor et al. 2000; Lee y Powers 2001).

Se ha observado que la región del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) del genoma humano, denominado *Human Leukocyte Antigen* (HLA) contiene cientos de genes involucrados en la función inmune y se considera que gran parte del riesgo de padecer AR se debe a la presencia del llamado epítipo compartido en la región HLA-DRB1 (Verpoort et al. 2007; van der Woude et al. 2010). Esto sugiere que existe una cierta predisposición en la selección del repertorio de células T, en la presentación antigénica o en la afinidad hacia ciertos péptidos, que podría inducir una respuesta inmunitaria adaptativa autorreactiva.

Sin embargo, el componente ambiental juega un papel igualmente importante en la etiología de la AR, ya que se han relacionado infecciones de origen vírico y bacteriano

1. Introducción

(virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, etc.) y sus productos (como las proteínas de choque térmico) con el desarrollo de AR y, aunque el mecanismo de actuación no está muy claro, parece ser que algún tipo de mimetismo molecular podría explicar esta relación (Kamphuis et al. 2005). La formación de inmunocomplejos durante la infección podría inducir la aparición del factor reumatoide, autoanticuerpos de alta afinidad contra la porción Fc de las inmunoglobulinas que están implicados en la patogénesis de la AR y que además se utilizan en clínica como marcador diagnóstico.

1.1.3 Fisiopatología

La AR se caracteriza por la inflamación de la membrana sinovial y la destrucción progresiva del cartílago articular y del hueso, con alteraciones estructurales, dolor y la consiguiente limitación funcional (Bingham 2002). El proceso inflamatorio está dirigido fundamentalmente por la producción de mediadores solubles, en su mayoría citocinas y quimiocinas pero también factores de crecimiento, enzimas degradativas, radicales oxigenados etc., cuyo efecto final es la destrucción del cartílago y del hueso subyacente, así como diversas manifestaciones extraarticulares.

A lo largo de este proceso inflamatorio crónico, la articulación sufre una proliferación de la membrana sinovial (hiperplasia), una infiltración de células inflamatorias, un aumento del líquido sinovial y una mayor vascularización en la zona afectada (Figura 3).

La presencia de un amplio espectro de células inflamatorias tales como monocitos, macrófagos, fibroblastos, linfocitos T y B, leucocitos polimorfonucleares (PMNs) y células plasmáticas, provoca una respuesta inmune continuada en la articulación reumática.

1. Introducción

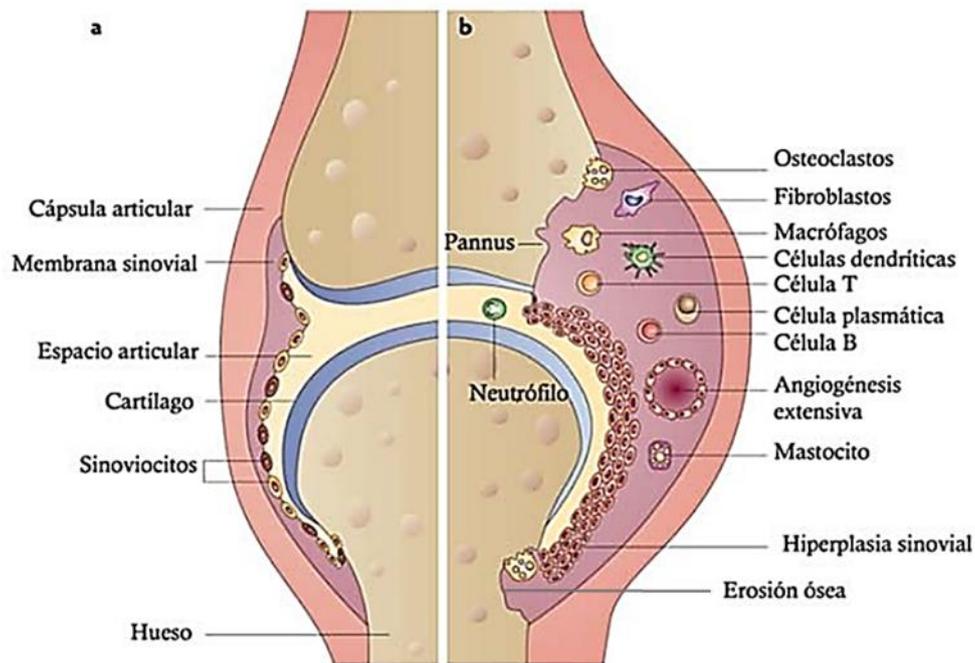


Figura 3. Imagen ampliada de una articulación sana (a) comparada con una artrítica (b). Destaca la erosión ósea, la hiperplasia sinovial, la angiogénesis, la formación del pannus y la infiltración de gran cantidad de células inflamatorias en la articulación artrítica. Imagen obtenida de <https://es.slideshare.net/lordjaaen/artritis-reumatoide-1-11962471>

1.1.3.1 Inflamación de la membrana sinovial

Las articulaciones están compuestas por una base de hueso esponjoso aplanado, cubierto por una capa fina y densa de hueso cortical, que a su vez está recubierto por cartilago articular. La cavidad existente entre los huesos de la articulación alberga la membrana sinovial, que recubre las superficies óseas y produce el fluido sinovial. Este fluido ocupa la cavidad articular y su finalidad es lubricar y facilitar el movimiento articular, amortiguando los choques (Wooley et al. a 2005).

En condiciones fisiológicas, la membrana sinovial presenta una estructura organizada mostrando principalmente dos tipos de sinoviocitos: tipo A (tipo macrófago) y tipo B (tipo fibroblasto). Los sinoviocitos tipo A tienen la función de fagocitar activamente sustancias exógenas que son retenidas en la cavidad articular y además tienen capacidad presentadora de antígenos. Los sinoviocitos tipo B son las células responsables del mantenimiento de la matriz sinovial y son los principales productores

1. Introducción

de fluido sinovial que funciona como lubricante articular y transportador de nutrientes a la articulación (revisado en Iwanaga et al. 2000; Nozawa-Inoue et al. 2003).

La formación de *pannus* es uno de los procesos más característicos en la AR. Este término hace referencia a un tejido sinovial local de carácter invasivo responsable de la degradación del cartílago, de los ligamentos y del hueso subcondral, favoreciendo la erosión general de la articulación (Brenchley 2000).

1.1.3.2 Destrucción del cartílago

El cartílago está compuesto por una matriz extracelular y por las células residentes exclusivas del cartílago, llamadas condrocitos, responsables del mantenimiento y síntesis de dicha matriz. La composición de esta matriz extracelular consiste en una red fuertemente organizada de fibras de colágeno, formada prácticamente por colágeno tipo II, incluyendo un entramado de proteoglicanos como el agregano, asociados a glicosaminoglicanos hidrofílicos y a ácido hialurónico.

Uno de los primeros signos de daño estructural en la matriz del cartílago es la depleción de proteoglicanos (Saxne y Heinegard 1992). Este proceso reversible puede ocurrir como resultado de la degradación enzimática mediada por enzimas proteolíticas y la reducción en la síntesis *de novo* de proteoglicanos por los condrocitos residentes. Si la depleción de proteoglicanos está seguida de la destrucción enzimática de la red de colágeno, el proceso puede llevar a una destrucción total e irreversible del cartílago producida por la muerte celular de condrocitos y una marcada erosión de su superficie. La mayor parte de este proceso de degradación es consecuencia de la actividad de la familia de las metaloproteasas de matriz (MMPs) (revisado en Martel-Pelletier et al. 2001).

1.1.3.3 Erosión del hueso

La inflamación crónica que se produce en la articulación durante la AR conlleva la erosión ósea. Esta destrucción del hueso está mediada por unas células multinucleadas, móviles, gigantes, que degradan, reabsorben y remodelan el hueso, llamadas osteoclastos. Los osteoclastos se forman por la fusión de varias células de la familia monocito/macrófago que se diferencian a partir de precursores hematopoyéticos en un

1. Introducción

proceso dirigido por distintas citocinas. Entre las citocinas esenciales que participan en este proceso están el “ligando del receptor activador del factor de transcripción nuclear κ B” conocido como RANKL y el “factor estimulador de colonias de macrófagos”, el M-CSF. Ambas son indispensables para la diferenciación de los osteoclastos ya que la ausencia de cualquiera de ellas, bloquea este proceso (Teitelbaum 2000).

M-CSF se expresa en células sinoviales y en menor grado en linfocitos T. El factor de necrosis tumoral- α (TNF α) induce la expresión de esta citocina, la cual se une a su receptor en los monocitos, sin embargo, esta interacción es insuficiente para la diferenciación final de estas células. Es imprescindible la presencia de RANKL que también está expresado en células sinoviales y en linfocitos T sinoviales activados. Su expresión está regulada por citocinas como TNF α , interleucina (IL) -1, IL-6 e IL-17. Al unirse a su receptor RANK en los monocitos, se induce la diferenciación final hacia osteoclastos y la activación de sus mecanismos de resorción ósea.

La función de RANKL también está modulada por la presencia de otra citocina, la osteoprotegerina (OPG), que es un receptor soluble, producido por células sinoviales y que actúa como señuelo, bloqueando la interacción RANKL-RANK (Bezerra et al. 2005). Durante la AR hay un desbalance en la relación RANKL/OPG favoreciendo la pérdida de hueso. Es interesante señalar que, en modelos animales de artritis, la sobreexpresión experimental de OPG impide totalmente la reabsorción ósea, sin que se modifique la inflamación.

1.1.3.4 Angiogénesis

La angiogénesis es el término con el que se conoce la formación de nuevos capilares o neovascularización a partir de vasos preexistente. Este es un proceso precoz y crítico en la fisiopatología de la AR, que depende de la activación, la migración y la proliferación de células endoteliales, con un papel importante de la IL-17. La proliferación celular asociada a la membrana sinovial y tejido conectivo, unido a la formación de *pannus*, provocan un incremento en el consumo de oxígeno y nutrientes. Por esta razón, el incremento de vascularización permite mantener los requerimientos energéticos del tejido sinovial hipertrófico y favorece la llegada de nuevas células inflamatorias a la cavidad sinovial (Choy y Panayi 2001). Este fenómeno, contribuye a mantener el

1. Introducción

desarrollo del *pannus* y la cronicidad de esta patología (revisado en Walsh y Pearson 2001).

1.1.4 Inmunopatogenia

Como ya hemos mencionado, la AR es una enfermedad autoinmune que se desencadena por uno o varios factores desconocidos que inducen la aparición de autoantígenos. La presentación de estos antígenos a los linfocitos T CD4⁺ estimula la expresión de citocinas e induce y aumenta la proliferación de linfocitos B, con la consiguiente producción de anticuerpos.

De este modo, la patología de la AR comprende dos componentes claves: el autoinmunitario y el inflamatorio.

Antes de desarrollar este apartado y para facilitar su comprensión, se explicarán brevemente las principales características de la respuesta inmunológica.

1.1.4.1 El sistema inmunológico

El sistema inmunológico está formado por el sistema inmunológico innato, evolutivamente menos desarrollado, y el sistema inmunológico adaptativo, altamente específico. El **sistema inmunológico innato** actúa como una primera línea de defensa reconociendo y respondiendo a los patógenos de una forma genérica a través de un grupo limitado de receptores específicos (Medzhitov 2007). Este sistema no confiere una inmunidad duradera contra el patógeno. Por otro lado, el **sistema inmunológico adaptativo** reconoce un amplio espectro de antígenos a partir de un conjunto diverso de receptores reordenados somáticamente (receptores de células T y células B). La habilidad de generar estas respuestas específicas se mantiene en el organismo gracias a las células de memoria. La combinación entre la inmunidad innata y adaptativa permite reconocer y eliminar patógenos con una mayor eficacia y reparar el daño causado por los mismos, aumentando la supervivencia de los organismos infectados (Figura 4) (Medzhitov 2007).

1. Introducción

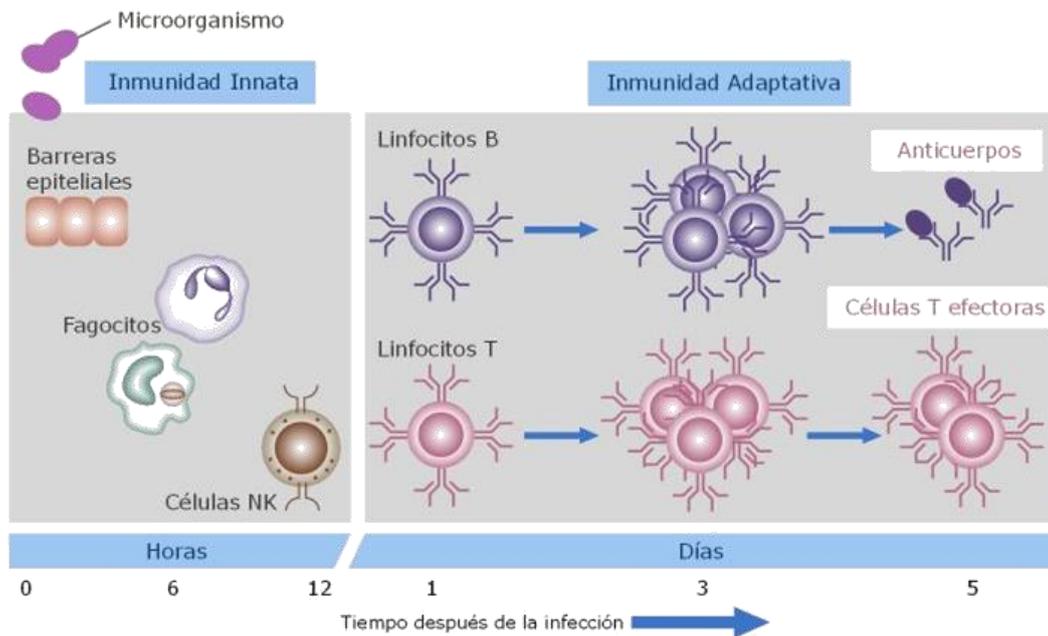


Figura 4. Esquema representativo de la inmunidad innata y adaptativa en respuesta ante un antígeno. Imagen de <http://www.educarchile.cl/ech/pro/app/detalle?id=136963>

Cuando se desencadena una infección o daño tisular, se activan células del sistema inmunológico residentes en el tejido afectado como macrófagos, mastocitos y neutrófilos, que tras reconocer al patógeno o el daño causado, liberarán diferentes mediadores como citocinas, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno (ROS), aminas vasoactivas, y productos proteicos, dirigidos a aislar el daño y reclutar nuevas células inmunológicas desde el torrente sanguíneo hasta el lugar de la inflamación (Lawrence et al. 2002). Una vez el patógeno ha sido eliminado y se ha reparado el daño tisular, se produce una fase de resolución caracterizada por el control y desactivación de los componentes celulares y mediadores moleculares del sistema inmunológico innato. Por tanto, el proceso inflamatorio es importante para la supervivencia, pero controlar la magnitud de la respuesta inflamatoria es crucial. Respecto a la respuesta inmunológica adaptativa, los linfocitos T y B juegan un papel fundamental.

Los linfocitos T pueden clasificarse en diferentes poblaciones según sus marcadores de superficie y su función. Los **linfocitos Th** (T CD4+ o "helper") modulan las respuestas de células B y T CD8+. Las células Th se clasifican en distintos tipos dependiendo del perfil de citoquinas que a su vez, están relacionadas con el desarrollo de diferentes funciones inmunológicas. Así, distinguimos células **Th1** (que producen principalmente IL-2,

1. Introducción

interferón- γ (IFN- γ) y TNF α , células **Th2** (que producen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, entre otras), células **Th17** (que producen IL-17, IL-22), y células **T reguladoras** (Treg) (Reinhardt et al. 2006) (Figura 5).

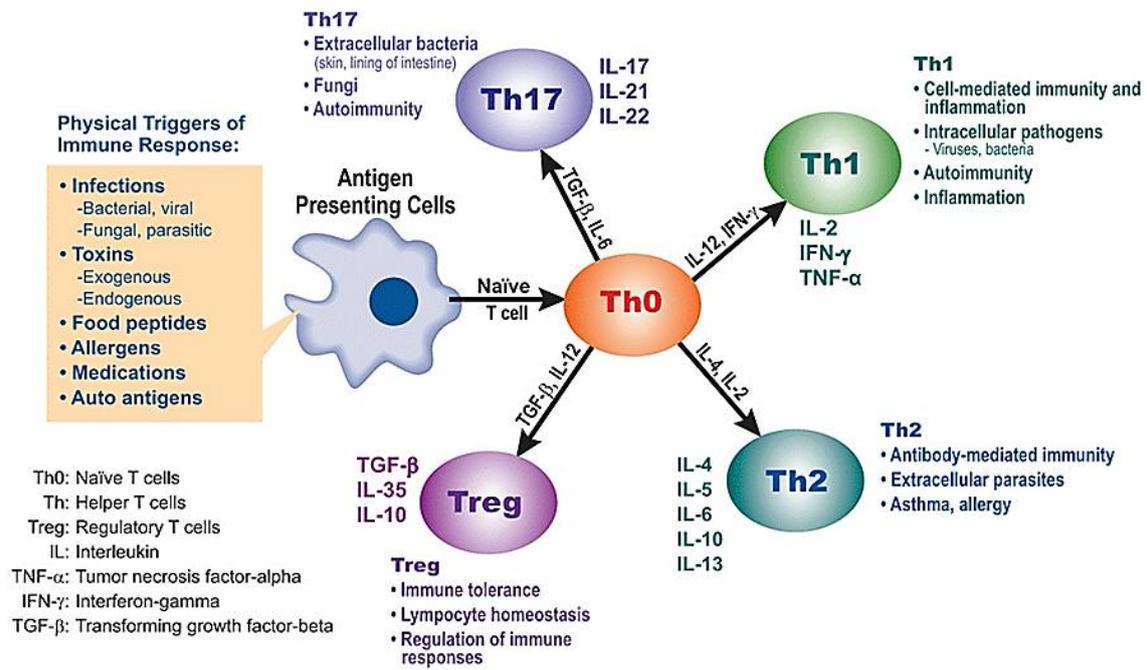


Figura 5. Esquema de las distintas formas de diferenciación del linfocito T helper naives en función de las citocinas presentes. Una vez diferenciado en un tipo celular concreto, puede ejercer distintas funciones liberando interleucinas u otros mediadores para acabar con el agente infeccioso.

Por otro lado, los **linfocitos T citotóxicos** (T CD8+) matan a las células diana, generalmente células infectadas con virus y células tumorales (Figura 6). Existe una importante interconexión en la producción y generación de los diferentes tipos celulares durante el desarrollo de la respuesta inmunológica, que en algunos casos, puede resultar antagónica (por ejemplo, las citocinas producidas por las células Th1 reprimen la respuesta Th2, y al revés). En general, una respuesta Th1/Th17 es protectora frente a infecciones causadas por la mayoría de patógenos. Las citocinas Th1 y Th17 activan la inmunidad innata y promueven la producción de anticuerpos capaces de opsonizar y fijar el complemento, mientras que una respuesta Th2 tiene un carácter antiinflamatorio, y es efectiva en la erradicación de patógenos extracelulares (Figura 6).

1. Introducción

En cualquier caso, la activación errónea o exagerada de estas poblaciones puede conducir a diferentes condiciones patológicas (Szabo et al. 2003; Ansel et al. 2006).

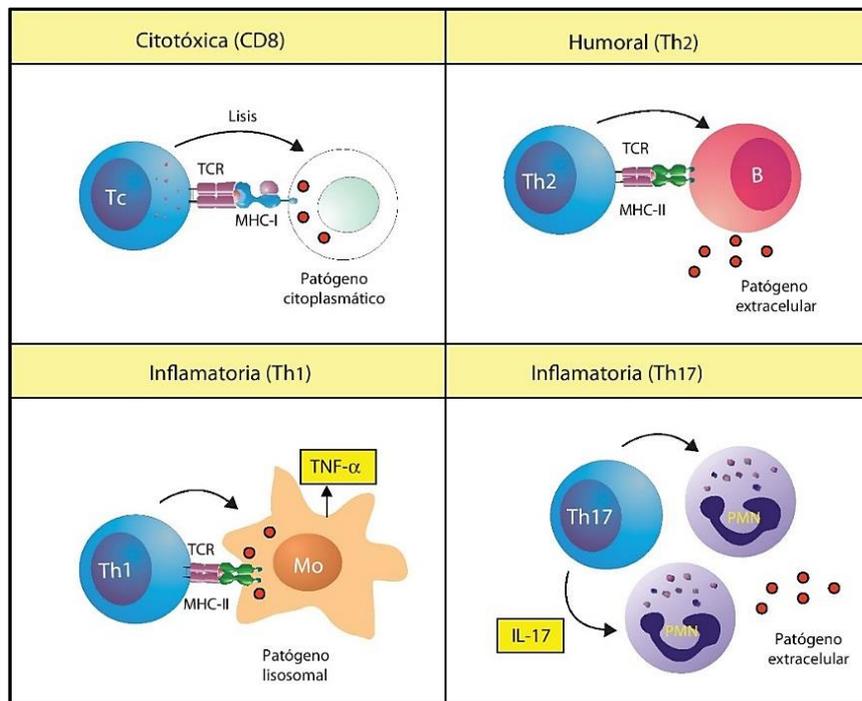


Figura 6. Diagrama de las distintas respuestas inmunes mediadas por células T. La respuesta citotóxica está mediada principalmente por los linfocitos T CD8⁺ y el complejo de histocompatibilidad de tipo I (MHC-I) frente a patógenos generalmente citoplasmáticos. La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa contra los microorganismos extracelulares y se produce tras el reconocimiento de un antígeno por parte del linfocito B y su posterior interacción con el linfocito Th (CD4⁺ o “helper”) asociado al MHC-II. La respuesta Th1 es altamente efectiva en la eliminación de patógenos intracelulares mientras que la respuesta Th17 desempeña un papel fundamental en la respuesta contra bacterias de crecimiento extracelular y hongos. Asimismo, se ha descrito para las células Th17 un efecto proinflamatorio que les permite hacer de puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Bettelli et al. 2007; Matsuzaki y Umemura 2007).

1.1.4.2 Infiltración y activación celular

La mayoría de las células que se infiltran el tejido sinovial son células T CD4⁺ (Goronzy y Weyand 2004). Esta migración está facilitada por la presencia de moléculas de adhesión, tanto en las células endoteliales, como en los propios linfocitos, dando lugar a la activación de las células T en la membrana sinovial que tapiza la superficie articular y las vainas tendinosas. Entre estas células inflamatorias, los linfocitos Th17, secretores

1. Introducción

de la citocina IL-17, parecen desempeñar un papel iniciador, interaccionando con células dendríticas, macrófagos y linfocitos B (Miossec et al. 2009). Los linfocitos Th17, cuya proliferación está inducida por la IL-23, se asocian a procesos inflamatorios crónicos y autoinmunes promovidos fundamentalmente por el efecto proinflamatorio de la IL-17. Entre ellos destaca la AR, ya que se ha encontrado que la expresión de IL-17 está elevada en las zonas afectadas (Mellado et al. 2015).

Los macrófagos son células fundamentales en la fisiopatología de la AR y la magnitud de su infiltración se correlaciona con los síntomas, probablemente debido a la secreción de mediadores proinflamatorios claves, como el TNF α y la IL-1 β , implicados en la perpetuación de la inflamación crónica (Hamilton y Tak 2009).

Los fibroblastos sinoviales se activan inicialmente por el microambiente local y posteriormente adquieren un fenotipo pseudomaligno con regulación al alza de oncogenes, inhibición de la apoptosis y secreción de citocinas, quimiocinas, metaloproteinasas de matriz (MMPs) y catepsinas, que median el proceso inflamatorio crónico y catalizan la destrucción articular (Chang et al. 2010).

Los linfocitos B actúan mediante la producción de autoanticuerpos (células plasmáticas sinoviales), como células activadoras de los linfocitos T en su función de células presentadoras de antígeno (APC) y de activación de fibroblastos mediante la secreción de TNF α , IL-6 y linfotoxina β . Estas células juegan un papel primordial en la patogenia de la AR, como puede deducirse del éxito que han tenido las terapias con Rituximab, un anticuerpo monoclonal que induce la muerte por apoptosis de los linfocitos B a lo largo de su desarrollo (Edwards et al. 2004).

Por último, se produce una activación e hiperplasia de los mastocitos a nivel articular. El tejido inflamatorio o *pannus* adquiere la capacidad de invadir y destruir el cartílago. La función de las células T CD4⁺ reguladoras está disminuida, lo que contribuye al desequilibrio entre los brazos efector y regulador de la inmunidad.

La destrucción tisular lleva a la aparición de neoantígenos como el colágeno tipo II, constituyente principal del cartílago articular, lo que contribuye a la cronicidad de la inflamación. La enorme infiltración de linfocitos en la membrana sinovial, podría

1. Introducción

corresponder al reclutamiento celular estimulado por la aparición de nuevos antígenos. La interacción de las principales células implicadas en la fisiopatología de la AR se esquematiza en la Figura 7.

La AR puede afectar también a otros órganos o sistemas, causando problemas hepáticos, carditis, arteriosclerosis precoz, enfermedad cerebrovascular, depresión, etc. o manifestaciones sistémicas, como astenia marcada, anemia y osteoporosis, llegando a la mortalidad en estos pacientes.

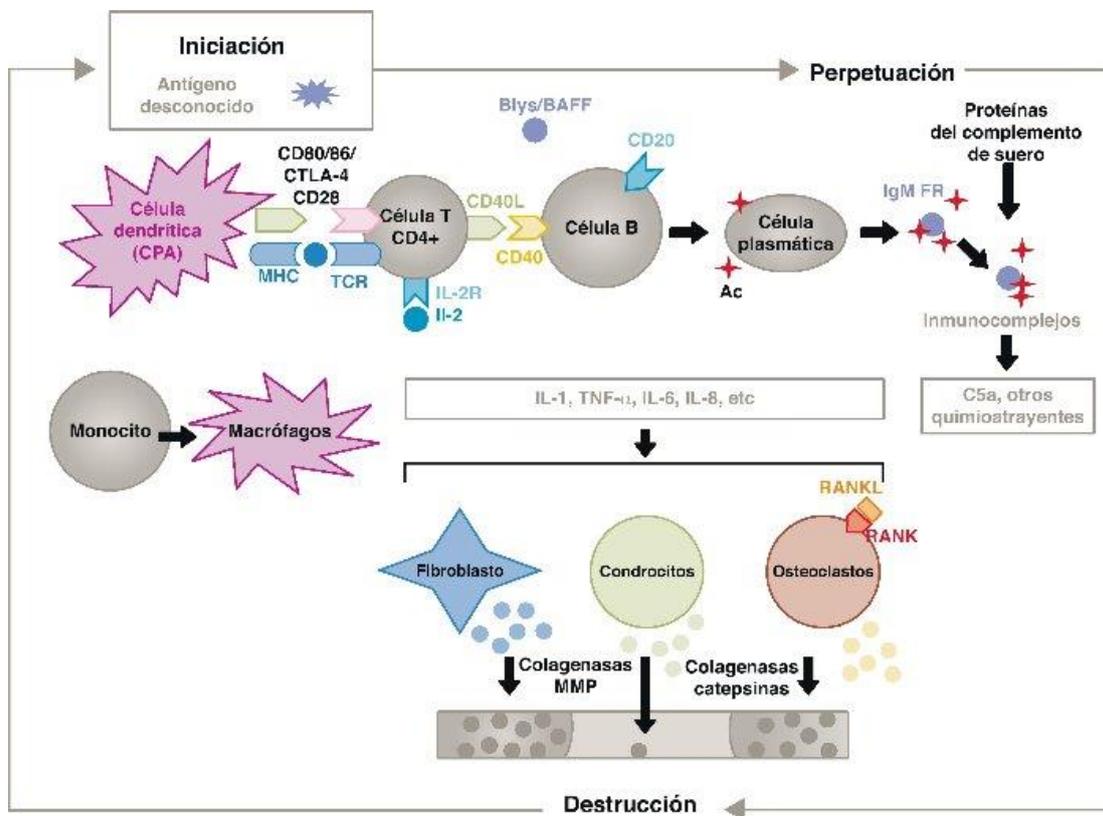


Figura 7. Esquema de la fisiopatología de la AR. Interacción de las principales células implicadas en la fisiopatología de la sinovitis y resorción ósea, culminando en la liberación de enzimas y daño tisular (Herrero-Beaumont et al. 2012).

1.1.4.3 Citocinas y receptores de citocinas expresados en los tejidos de la articulación

Las citocinas proinflamatorias actúan como moléculas efectoras fundamentales: el TNF α y la IL-1 β son los principales componentes del proceso inflamatorio y parecen actuar sinérgicamente en la patogénesis de la enfermedad, contribuyendo a la cronicidad de la misma, por lo que se definieron como las primeras dianas terapéuticas (Feldmann y Maini 2008). Ambas citocinas, liberadas principalmente por macrófagos y linfocitos, son

1. Introducción

responsables de inducir la síntesis de quimiocinas, como IL-8 (CXCL-1 en ratón) y moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), aumentar la producción de ROS, inducir la expresión de enzimas proinflamatorias, como ciclooxigenasa (COX)-2 y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), e incrementar la producción de enzimas degradativas, como las MMPs, que degradan la matriz extracelular del cartílago. El TNF α es un estímulo importante para las células productoras de mediadores inflamatorios (citocinas, MMPs, óxido nítrico, prostaglandina (PG) E2, etc.), mientras que la IL-1 β media la destrucción de cartílago y hueso a través de la secreción de MMPs, disminución de la síntesis de glicosaminoglicanos, etc. (Dieguez-Gonzalez et al. 2009).

La **PGE₂** es un potente vasodilatador que actúa junto con otros mediadores aumentando el flujo sanguíneo local y la permeabilidad capilar. Además produce hiperalgesia, potenciando el efecto de la bradicinina mediante la sensibilización de las fibras aferentes C.

La **IL-17** producida por los linfocitos Th17 u otras células de las articulaciones, es un potente quimioatrayente para los neutrófilos, y a su vez, los neutrófilos activados son productores de IL-17. En cualquier caso, un incremento local en la producción de IL-17 induce la activación de sinoviocitos y osteoclastos y potencia la actividad de otras citocinas proinflamatorias, produciendo la inflamación de la articulación y la degradación del hueso y de los proteoglicanos del cartílago (Kim et al. 2015). La IL-23 se expresa intensamente en las articulaciones inflamadas, induciendo la producción de IL-17 en modelos murinos de la AR.

Otra citocina proinflamatoria, que fue descrita al final de los años ochenta en el tejido sinovial reumatoide, es la **IL-6**. Se identificó como un factor producido por los linfocitos T y B y, al igual que la IL-1, contribuye al desarrollo de osteoporosis y destrucción articular en la AR mediante la proliferación de los fibroblastos sinoviales y de la diferenciación de los osteoclastos (Pablos Alvarez 2009).

1. Introducción

1.1.5 Farmacoterapia de la AR

En general, la farmacoterapia de la AR incluye antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) para el control del dolor, el uso selectivo de dosis bajas por vía oral o intraarticular de glucocorticoides y la iniciación temprana de antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME).

Los *antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)*, se aplican en el inicio de la AR para reducir el dolor y la tumefacción de las articulaciones. Controlan el dolor al inhibir la formación de PGs pero no son capaces de disminuir la progresión de la enfermedad.

Los *glucocorticoides*, potentes antiinflamatorios e inmunosupresores, regulan la expresión de diferentes genes y son capaces de reducir la progresión de la enfermedad (Kirwan et al. 2007). Deben usarse dosis mínimas debido al riesgo elevado de efectos colaterales como osteoporosis, cataratas, síntomas cushinoides e hiperglucemia. Los glucocorticoides son útiles en las primeras etapas de la AR, bien solos, o asociados a AINEs cuando estos no son eficaces en el control de los síntomas de la enfermedad.

Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad como el **metotrexato**, que es el fármaco de este grupo más ampliamente utilizado una vez diagnosticada la enfermedad. Este fármaco inhibe la proliferación celular, la activación de células T e induce la apoptosis por modulación del estrés oxidativo (Herman et al. 2008). La **leflunomida** también inhibe el sistema inmunitario y se utiliza sólo o en combinación con el metotrexato (Maddison et al. 2005).

La terapia biológica se basa en la utilización de anticuerpos monoclonales o proteínas recombinantes capaces de inhibir o bloquear la acción de una molécula proinflamatoria. Los primeros fármacos biológicos en desarrollarse fueron el **Infliximab** y el **Adalimumab**, anticuerpos monoclonales frente al TNF α , y el **Etanercept**, forma recombinante del receptor p75 del TNF α . Recientemente se han desarrollado otros fármacos anti-TNF α , como el **Golimumab** y **Certolizumab-Pegol** (Tak y Kalden 2011). Frente a los efectos producidos por la IL-1 β existe el **Anakinra**, antagonista del receptor tipo I. Este fármaco no es uno de los de primera elección ya que su eficacia es menor que la de otras terapias biológicas utilizadas (Zwerina et al. 2005; Singh et al. 2009). Otros anticuerpos

1. Introducción

monoclonales empleados en el tratamiento de la AR son el anti-IL-6 o **Tocilizumab** y el anti-CD20 conocido como **Rituximab**, que bloquea la actividad de las células B (Nishimoto et al. 2004); (Reff et al. 1994). Por último, el **Abatacept** es una proteína de fusión CTL4-IgG1 capaz de inhibir la activación de las células T (Kremer et al. 2003). Su uso en la AR está aprobado desde 2005 y ha demostrado su eficacia y seguridad en el tratamiento de esta enfermedad (Tak y Kalden 2011).

Terapias Adyuvantes: Existen otros tratamientos no farmacológicos, como terapias de spa y ejercicios. A corto plazo se obtienen beneficios con la educación y el abordaje multidisciplinario del paciente. Cuando el dolor es inaceptable, la pérdida de la movilidad es importante o el deterioro funcional es grave, debe considerarse el tratamiento quirúrgico.

Las terapias biológicas disponibles en la actualidad, dirigidas fundamentalmente frente a citocinas o a moléculas expresadas en determinadas células implicadas en la etiopatogenia de la AR, han transformado radicalmente la evolución de la enfermedad, permitiendo a los pacientes mantener su independencia funcional y mejorando su calidad de vida. El mayor reto actual consiste en identificar biomarcadores que permitan un diagnóstico más precoz, marcadores pronósticos y nuevas dianas terapéuticas más eficaces que permitan optimizar el tratamiento de manera individualizada (Isaacs 2010).

1.2 MODELOS ANIMALES DE ARTRITIS EXPERIMENTAL

Desde hace años, se han utilizado los modelos animales para el estudio de la patogénesis de la artritis reumatoide. Aunque existen muchas limitaciones evidentes, el uso de estos modelos animales ha permitido no solo avanzar en el conocimiento de los mecanismos implicados en la enfermedad, sino que además, nos ha proporcionado las herramientas necesarias para el desarrollo y para la comprobación de la efectividad de posibles tratamientos de esta patología y su posterior aplicación en humanos (Hu et al. 2013). Algunas de las principales ventajas que nos aporta el uso de modelos de experimentación animal, son la reducción de la heterogeneidad de las muestras de estudio al tratarse de animales genéticamente homogéneos y la posibilidad de realizar

1. Introducción

investigaciones en un ambiente totalmente controlado por el investigador. Los estudios realizados en muestras humanas presentan una heterogeneidad genética que determina su variabilidad y suele ser útil en cuanto a la identificación de biomarcadores predictivos de la enfermedad, pero en muchas ocasiones dificulta una traslación preclínica de los hallazgos. De igual forma, ningún modelo animal se puede equiparar totalmente a lo que sucede en humanos en términos del desarrollo de la patología o respuesta a un posible tratamiento. El desencadenamiento de la AR y los factores que provocan la cronicidad de la enfermedad no son extensamente conocidos y esta fase, aun siendo crucial para el desarrollo de posibles terapias preventivas, no puede ser investigada en humanos, necesiándose modelos animales que ayuden a determinar los mecanismos implicados y el desarrollo de la patología. Aunque en humanos el estudio de la AR ha permitido conocer la afección en las articulaciones dañadas, establecer elementos diagnósticos (autoanticuerpos como el factor reumatoide o anticuerpos anti-proteínas citrulinadas) y algunas terapias (Rituximab), la limitación en la obtención de ciertos tejidos (médula ósea, ganglios linfáticos, bazo...) muy importantes en el desencadenamiento de la respuesta autoinmune y el desarrollo de terapias más eficaces, implican la necesidad del uso de modelos animales para el completo conocimiento de la AR (Asquith et al. 2009).

En la mayoría de casos, el modelo animal refleja aspectos específicos de la enfermedad y puede variar de un animal a otro y entre distintas cepas dentro de una especie determinada (DBA1/J vs C57BL/6 en ratón) (Vincent et al. 2012). La elección del modelo animal, es, por tanto, compleja y debe atenerse a la disponibilidad del animal, finalidad de la investigación, etc.

1.2.1 Artritis inducida por colágeno (CIA)

De entre todos los modelos animales de AR humana, el CIA es el modelo más empleado. En 1977, Trentham y colaboradores, describieron la primera inmunización de ratas con una emulsión de colágeno tipo II de origen humano, pollo o rata y adyuvante completo de Freund, resultando un proceso autoinmune contra el colágeno propio de la rata que derivaba en una poliartritis erosiva (Trentham et al. 1977). Posteriormente otros grupos

1. Introducción

de investigación describieron protocolos similares para la inducción de la artritis en ratón.

Como sucede con la AR en humanos, la susceptibilidad a desarrollar CIA en ratón se relaciona con la expresión de un determinado MCH de clase II, que en ratón se denomina complejo H-2. Las estirpes de ratón susceptibles de desarrollar CIA pertenecen a los haplotipos: H-2^q (por ejemplo, los ratones DBA/1J y B10.Q), H-2^r (ratones B10.RIII) y H-2^b (ratones C57BL/6) (Wooley et al. 1981; Wooley et al. 1985; Inglis et al. 2007). Se ha cuestionado en varios trabajos la utilidad de la cepa C57BL/6 para el estudio del modelo CIA, debido a que muestran cierta resistencia a desarrollar el proceso artrítico. Dicha resistencia está causada por defectos en la respuesta inmune secundaria concretamente en la respuesta de las células T y en los niveles significativamente más bajos de anticuerpos anti-CII observados después de la segunda inmunización en comparación con los ratones DBA/1J (Pan et al. 2004). No obstante, son varios los trabajos publicados donde esta estirpe es la empleada como modelo de CIA en diversos contextos (Postigo et al. 2012; Frey et al. 2011) aunque hay que destacar que estos ratones C57BL/6 desarrollan una artritis con menor incidencia y severidad que la observada en la cepa de ratón DBA/1J, además existe una mayor variabilidad entre individuos y la especificidad en la respuesta inmune no está del todo clara (Backlund et al. 2013).

Como hemos mencionado, ningún modelo representa completamente la AR humana, pero el CIA tiene muchas similitudes con esta patología, entre las que destaca la afectación de varias articulaciones, la hiperplasia sinovial con infiltración de células en la articulación, la destrucción del cartílago y hueso, la formación del *pannus* y la susceptibilidad dependiente de las moléculas presentadoras de antígeno, así como la presencia de anticuerpos anticolágeno. Sin embargo, se diferencia en otros aspectos que implican a la afección asimétrica de las articulaciones, que en la AR humana es completamente simétrica y a la cronicidad más transitoria del CIA en comparación a la que se produce en la AR (Schurgers et al. 2011). Salvando estas limitaciones, el modelo CIA resulta de gran utilidad para el estudio del proceso inflamatorio y autoinmune que se produce en la AR, principalmente si se trabaja con la cepa de ratón DBA1/J.

1. Introducción

1.2.2 Modelo experimental de artritis inducida por transferencia de suero de ratones K/BxN

Los ratones K/BxN desarrollan de manera espontánea una artritis inflamatoria muy severa y destructiva en las articulaciones, tanto de patas delanteras como traseras. Esta artritis está mediada por una respuesta inmune en la que tienen un papel primordial las células T y células B que generan anticuerpos contra la glucosa 6 fosfato isomerasa (GPI).

El modelo de artritis K/BxN fue descubierto al cruzar ratones KRN TCR-transgénicos con ratones diabéticos no obesos (NOD o H2g7). La generación F1 entre KRN y NOD (abreviado K/BxN), expresa tanto el receptor de células T (TCR) KRN transgénico como el alelo A^{B7} del MHC de clase II. Esta combinación les permite desarrollar espontáneamente una enfermedad autoinmune crónica y progresiva localizada específicamente en las articulaciones de patas traseras y delanteras (Kouskoff et al. 1996); (Monach et al. 2008). El proceso artrítico en estos ratones K/BxN comienza a partir de las 3-4 semanas de edad y tiene muchas similitudes con la artritis humana, con formación de *pannus*, hiperplasia sinovial, infiltrado celular, aumento del líquido sinovial, degradación del cartílago y hueso y remodelado óseo en las zonas distales de la articulación en estadios avanzados de la enfermedad. El desarrollo de la enfermedad depende del reconocimiento por parte de las células T KRN TCR transgénicas de la enzima glicolítica GPI (Matsumoto et al. 1999), que conlleva la producción de elevados niveles de anticuerpos anti-GPI a través de la diferenciación y proliferación de células B. En este modelo de artritis, los anticuerpos IgG1 son el isotipo predominante. Estudios llevados a cabo en animales modificados genéticamente, muestran que tanto las células B como las células T KRN TCR-transgénicas son necesarias para iniciar el proceso inflamatorio autoinmune (Korganow et al. 1999). Una vez iniciada la artritis, la progresión de la enfermedad no requiere la presencia de linfocitos, sino que depende de los niveles elevados de anticuerpos anti-GPI.

La transferencia de suero de estos ratones artríticos K/BxN a ratones sanos induce una artritis similar en una amplia gama de cepas de ratón, debido a los niveles de anticuerpos que reconocen a la GPI. En los ratones receptores se produce una

1. Introducción

respuesta inflamatoria sincronizada, localizada mayoritariamente en la articulación del tobillo, que mimetiza la fase efectora de la enfermedad en ratones K/BxN, indicando que las Igs de suero artrítico son capaces de inducir sinovitis en las articulaciones (Maccioni et al. 2002). La enfermedad inducida por una única administración de suero K/BxN se resuelve con el tiempo, a menos que se lleve a cabo en los animales receptores una segunda inmunización con dicho suero (ver Material y métodos, apartado 3.1.2). Después de la inyección, los anticuerpos anti-GPI se localizan a los pocos minutos en las articulaciones distales, siendo este proceso dependiente de las células mastocíticas, neutrófilos y FcR. En humanos con AR, las concentraciones elevadas de anticuerpos anti-GPI se correlacionan con manifestaciones extraarticulares (van Gaalen et al. 2004).

El desarrollo de este modelo fácilmente inducible de artritis y con un comienzo rápido y sincronizado, ha sido especialmente valioso para estudiar los mecanismos por los que los autoanticuerpos anti-GPI inducen la inflamación específica conjunta. Además facilita el estudio de los mecanismos patológicos implicados en la fase aguda inicial de la respuesta inflamatoria articular, sin la confusa influencia de la fase inmunológica de la enfermedad. Este modelo de transferencia de suero es simple, produce el 100% de incidencia en ratones Balb/c y C57BL/6 y proporciona una rápida respuesta, siendo por tanto un modelo de AR muy práctico y resolutivo.

1.2.3 Otros modelos animales de AR

Existe una amplia variedad de modelos animales de AR, que pueden resultar útiles según las condiciones y los objetivos del estudio. Algunos de estos modelos se basan en la inducción de la artritis mediante la administración de suero de animales artríticos que contiene **anticuerpos anticolágeno tipo II** a animales sanos (Stuart y Dixon 1983) o mediante la combinación de una mezcla de varios anticuerpos anticolágeno II dirigidos a distintos epítomos del colágeno II (Holmdahl et al. 1986; Koobkokkruad et al. 2013). Este procedimiento, induce una artritis con menor dependencia de la respuesta de células T y células B, y con una infiltración celular en la articulación predominantemente de macrófagos y PMN (Santos et al. 1997).

1. Introducción

Otros modelos se basan en la inmunización de los ratones sanos con un **antígeno** (por ejemplo albúmina bovina sérica metilada, en adyuvante completo de Freund), seguido por la inyección intraarticular con el mismo antígeno (Brackertz et al. 1977). En este caso la respuesta inflamatoria está mediada por inmunocomplejos con la participación de las células T, pero no es un modelo muy útil debido a que no representa la patogenia de la enfermedad con tanta similitud como los anteriores modelos (Asquith et al. 2009). También se han utilizados **moléculas procedentes de microorganismos** e incluso bacterias para inducir la artritis en el ratón. Un ejemplo es la artritis inducida por inyección intraarticular de zimosán (Keystone et al. 1977) que da lugar a un proceso inflamatorio con hipertrofia e infiltración de linfocitos. Otro ejemplo es la artritis producida por pristano administrado intraperitonealmente, provocando una respuesta inflamatoria aguda seguida de una fase crónica poco severa (Wooley et al. 1989). La administración de proteoglicanos procedentes de cartílago humano también produce una artritis llamativa en la cepa de ratón BALB/c. Entre las **bacterias** utilizadas para inducir el proceso artrítico, están *Staphylococcus aureus* administrada por vía intravenosa a ratones C57BL/6 (Sakinienne y Collins 2002; Henningsson et al. 2010) y *Borrelia burgdorferi*. Ambas producen un proceso séptico que desencadena una enfermedad artrítica, en el caso de *Borrelia burgdorferi* de intensidad variable según la estirpe de ratón utilizada (Ma et al. 1998).

Otros modelos animales de AR, se basan en la **modificación génica**, utilizando ratones transgénicos para inhibir o potenciar la expresión de algún mediador inflamatorio. Ratones transgénicos que sobreexpresan TNF α desarrollan una artritis erosiva, inflamatoria y crónica. Este modelo, ha sido útil en el estudio de la participación de esta citocina en el proceso artrítico y en las terapias anti-TNF α para el tratamiento de la enfermedad en humanos (Keffer et al. 1991). El modelo SKG, consiste en otra modificación genética que afecta al gen responsable de la expresión de la proteína ZAP-70, y que provoca un defecto en la selección de los linfocitos T autorreactivos en el timo, produciendo linfocitos T CD4⁺ artritogénicos. Un factor limitante de este modelo, es que sólo se produce en ambiente muy controlado con ausencia total de gérmenes (Sakaguchi et al. 2003). Los ratones *SCID/humanos* generados por implantación de tejido sinovial humano de pacientes artríticos en ratones *SCID* (*severe combined*

1. Introducción

immunodeficiency), también sufren una artritis con importante destrucción del cartílago producida por los fibroblastos sinoviales (Geiler et al. 1994). Existen modelos artríticos que se producen por mutación génica basados en la deficiencia en la expresión del antagonista del receptor tipo I de IL-1 generando una respuesta mediada por linfocitos Th17 (Koenders et al. 2008), o por mutaciones en el receptor gp 130 que inducen la activación de STAT3 (Sawa et al. 2006). El *modelo DR4-CD4* humano en ratón afecta a la molécula HLA-DR*0401 produciendo un defecto en la respuesta Th1, lo que resulta de gran utilidad en el estudio de los mecanismo que producen la pérdida de la tolerancia en la fase inicial de la AR (Eming et al. 2002). Otro modelo reciente consiste en la delección genética de ADNasa II y del receptor tipo I del IFN, produciendo una artritis asociada a altos niveles del factor reumatoide y de anticuerpos contra proteínas citrulinadas (Kawane et al. 2006).

Existen por tanto muchos modelos animales de AR, la elección del más adecuado, vendrá determinada por varios motivos como la diana del estudio, la cepa de ratón necesaria, la duración del experimento, los parámetros a analizar, etc. Es transcendental seleccionar el modelo idóneo para que los resultados obtenidos sean extrapolables al ser humano.

1.3 RATONES *KNOCKOUT* Y RATONES CONDICIONALES

Los *knockout* son ratones a los que se ha inactivado o eliminado experimentalmente uno o más genes. Estos animales son valiosos aliados para averiguar la función del gen inactivado. Sin embargo, cuando el gen afectado es especialmente importante para el desarrollo o el metabolismo del organismo, se generan ratones que presentan problemas graves de salud o incluso mueren tras unos pocos días de vida. Este resultado indica que este gen está implicado en procesos vitales del organismo o que afecta a muchos sistemas, de forma que el modelo animal no permite avanzar mucho más, ya que es inviable seguir estudiando los efectos del gen en cuestión.

Para lograr salvar este inconveniente se desarrollaron los ratones *knockout* condicionales. Este tipo de ratones poseen una modificación silenciosa en el gen de interés. Dicha modificación consiste en un mecanismo interruptor que provoca la

1. Introducción

inactivación del gen que se está estudiando sólo en un tejido o en un tipo celular concreto. De esta forma, se mantiene el gen funcional en el resto del animal, al mismo tiempo que se puede estudiar su función de manera mucho más específica.

1.3.1 Generación de ratones condicionales

Para generar este tipo de animales, se emplea el sistema de recombinación Cre/loxP. El sistema Cre-loxP es la estrategia más utilizada en la mutagénesis dirigida específica de tejido. La colocación y orientación de los sitios loxP (que se introducen en la secuencia de ADN a recombinar) determinarán la secuencia genómica a escindir, mientras que la disponibilidad, en el tiempo y/o el espacio, de la recombinasa Cre, que se obtiene a partir de un transgén, dictará cuándo y dónde se produce la recombinación y por tanto, el *knockout*. Los sitios loxP se disponen en parejas flanqueando el segmento de ADN a eliminar. Cuando Cre se expresa, la recombinasa Cre se une a los sitios loxP, los corta por la mitad y después une las dos mitades restantes tras haber eliminado el ADN situado entre ambos.

1.3.2 Mecanismo de acción de la recombinasa Cre

La recombinasa Cre funciona como una topoisomerasa rompiendo el ADN y uniéndolo de nuevo sin requerir cofactores para recombinar secuencias loxP (Figura 8) (Hoess y Abremski 1984). Para circularizar el ADN viral, Cre reconoce los sitios loxP localizados en los extremos del ADN viral. Para la segregación de dímeros, Cre reconoce los sitios loxP de cada una de las moléculas hijas y, mediante recombinación, las separa en plásmidos individuales (Sternberg, et al. 1981).

Por otro lado, cada sitio loxP tiene 34 pb y está formado por una secuencia espaciadora central de 8 pb, el sitio de “crossing-over”, y dos secuencias flanqueantes palindrómicas de 13 pb, compuestos por dos elementos de unión de la recombinasa Cre “recombinase binding elements” (RBEs). El núcleo central asimétrico define la orientación del sitio loxP (Fig. 9) que determina si la recombinación dará lugar a escisión o inversión de la secuencia enmarcada entre los sitios loxP (Hoess y Abremski 1985).

1. Introducción

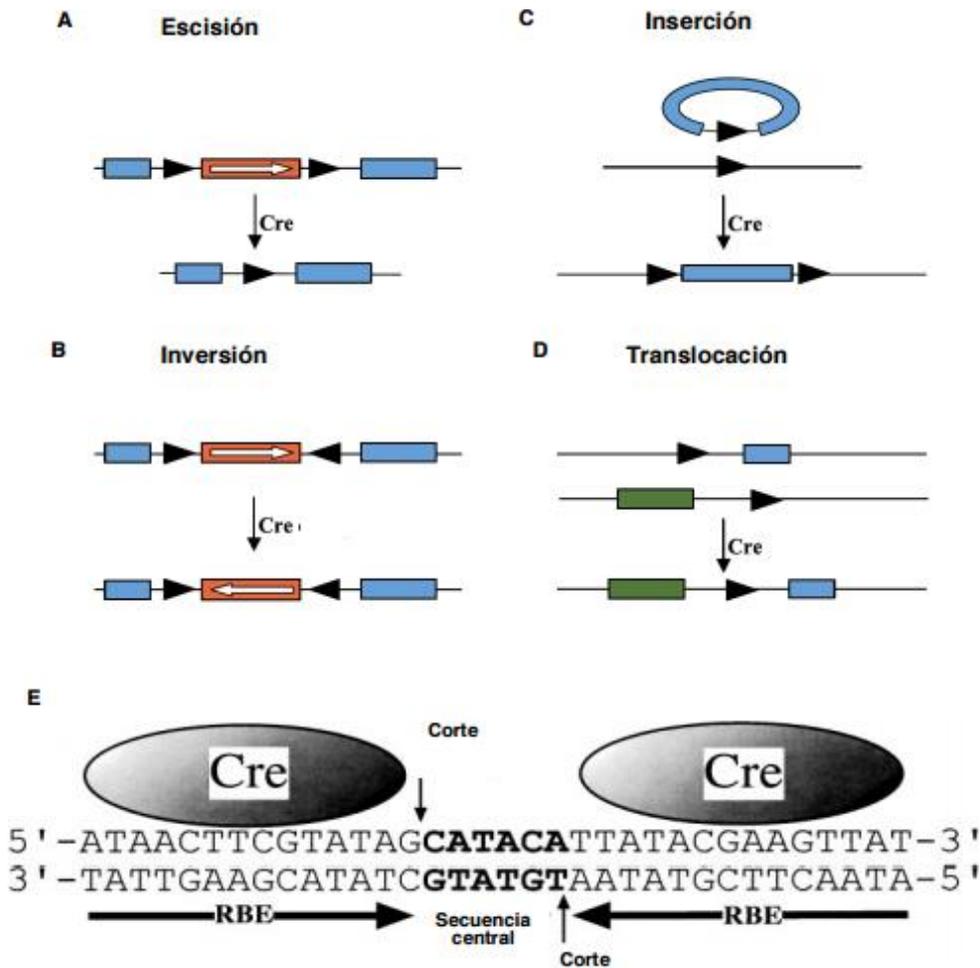


Figura 8. Modificaciones genéticas mediadas por la recombinasa Cre. Alteraciones moleculares en el genoma de ratón inducidas por la recombinasa Cre (Van Duyne 2001; Bockamp et al. 2002). A, la escisión del fragmento de ADN genómico comprendido entre dos secuencias loxP tiene lugar cuando dichos sitios están en la misma dirección; B, la inversión del fragmento del ADN comprendido entre dos sitios loxP con las orientaciones opuestas; C, la inserción del fragmento de ADN que conlleva un sitio loxP requiere la presencia de sólo un sitio loxP en el genoma de ratón sirviendo como aceptor molecular para insertar dicho fragmento; D, las translocaciones pueden ocurrir debido a la presencia de dos sitios loxP situados en dos cromosomas diferentes; E, Esquema de un sitio loxP. La secuencia loxP de 34 pb está compuesta por dos fragmentos de 14 pb de reconocimiento de la recombinasa Cre (RBEs) en forma de dos brazos invertidos alrededor de una región central de "crossing-over" de 6 pb. El corte del sitio loxP, tiene lugar en las fronteras de la región central (en negrita) y los RBEs cuando dos moléculas Cre se unen al sitio loxP (una a cada RBE).

Dado que Cre es una recombinasa específica de sitio, que no requiere cofactores, el desarrollo de un ensayo es muy simple, ya que sólo requiere la recombinasa Cre, dos secuencias de ADN que contengan los sitios loxP y algún procedimiento para verificar si

1. Introducción

la recombinación de ADN ha tenido lugar. Así, la generación de un animal KO condicional requiere el uso de dos líneas de ratones transgénicos (Figura 9).

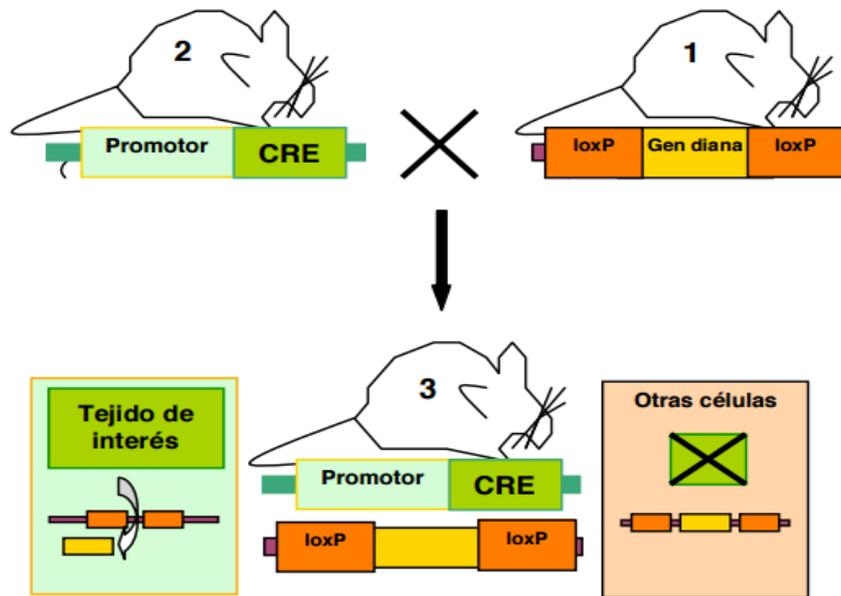


Figura 9. Representación esquemática de la generación de ratones KO condicionales. Se requiere el uso de dos líneas de ratones transgénicos: (1) ratón “floxed” que parte el gen de interés flanqueado por secuencias loxP. (2) ratón transgénico Cre con un promotor tejido específico que tendrá expresión de recombinasa Cre solo en ciertos tipos celulares dependiendo del promotor utilizado. El cruce del ratón “floxed” con el transgénico para Cre originará un animal (3) cuyo genoma es portador tanto el transgén Cre como el gen “floxed”. La expresión de Cre inducirá la recombinación de las secuencias loxP, de forma que se inactivará el gen diana sólo en tejidos en los que exista expresión de Cre.

Primero, un ratón “floxed” que porte el gen de interés con un fragmento a delecionar flanqueado por dos secuencias loxP y que se origina básicamente por el procedimiento antes descrito. Este alelo con secuencias loxP, pero que contiene aún el gen diana, es conocido en la jerga técnica como alelo “floxed” y es funcional en tanto no se produzca la recombinación. La segunda línea de ratones son transgénicos para Cre, donde el transgén porta un promotor específico de tejido (Orban et al. 1992). El cruce del ratón “floxed” con el transgénico para Cre originará un animal con células cuyo genoma porta tanto el transgén Cre como el gen “floxed”: la expresión de Cre inducirá la recombinación de secuencias loxP, de forma que se inactivará el gen diana, pero sólo en aquellos tejidos y momentos en los que exista la expresión de Cre. Por ejemplo, se han generado líneas Cre para hepatocitos (Postic y Magnuson 2000), células del miocardio

1. Introducción

(Agah et al. 1997), linfocitos B (Rickert et al. 1997), linfocitos T (Tian et al. 2013) osteoblastos (Dacquin et al. 2002), condrocitos (Ovchinnikov et al. 2000), entre otras.

En nuestro caso en concreto, utilizaremos ratones *knockout* condicionales para la enzima hemo oxigenasa-1 (HO-1) en las células inmunes procedentes de la línea mieloide, es decir granulocitos y monocitos/macrófagos (Figura 10).

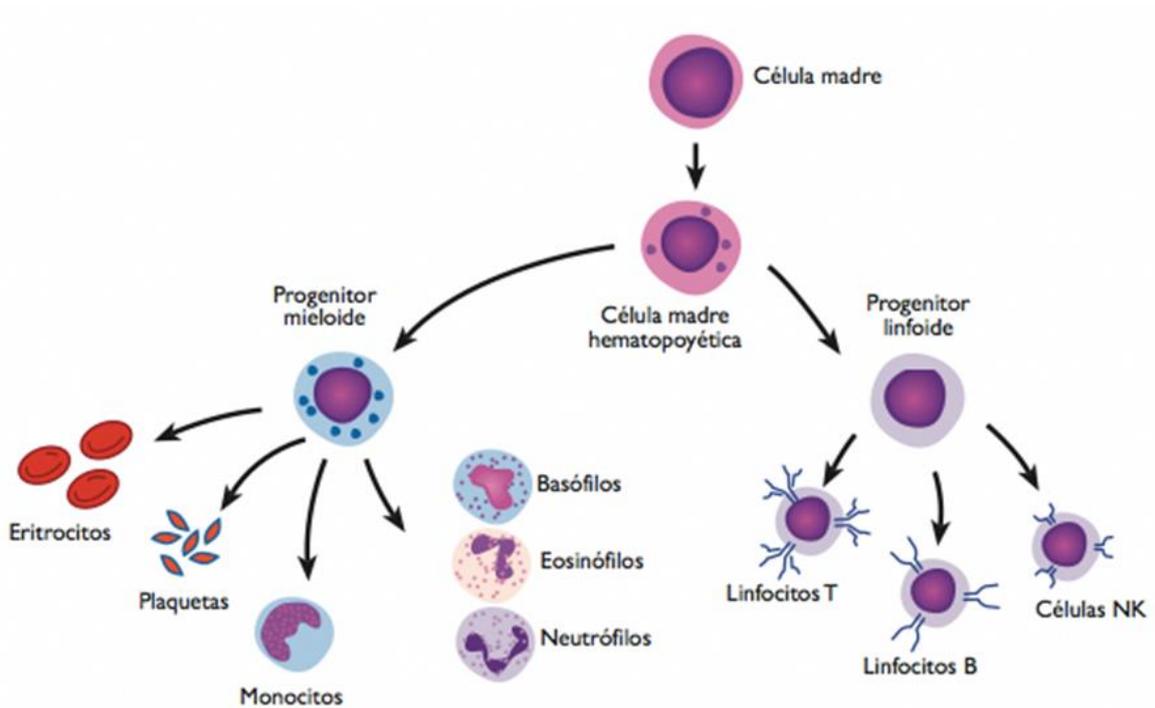


Figura 10. Diferenciación de una célula madre hematopoyética en dos líneas posibles, la linfoide y la mieloide. La línea linfoide dará lugar a la generación de linfocitos y células "natural killer" (NK), mientras que la línea mieloide derivará hacia los granulocitos (basófilos, eosinófilos y neutrófilos), los monocitos (y su posterior maduración en macrófagos) y a otras células carentes de núcleo como son los eritrocitos y las plaquetas. Imagen obtenida de <http://www.lvcm.com.ve/celulas.html>.

1.4 VÍA Nrf2/HO-1

El factor de transcripción 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como ARE (de sus siglas en inglés: "Antioxidant Response Element"), que puede ser activada por diversos compuestos oxidantes y/o electrófilos de naturaleza química muy diversa. La actividad

1. Introducción

del factor Nrf2 se encuentra constitutivamente reprimida debido a su unión con una proteína citoplásmica llamada Keap-1. Dicha unión fomenta la permanente degradación de Nrf2 por el proteosoma, por lo que el control primario de su función radica principalmente en su distribución subcelular, más que en la síntesis de novo. Se ha sugerido que el sistema Nrf2-Keap1 contribuye a la protección contra varias patologías como el cáncer, la toxicidad hepática y la inflamación, entre otras.

Nrf2 es sensible al balance redox intracelular. Numerosos estudios demuestran que el factor de transcripción Nrf2 se une a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) localizados en la región promotora de una gran variedad de genes que codifican para enzimas detoxificantes de fase II y proteínas antioxidantes inducibles por el estrés oxidativo y nitrosativo. La inducción de estas enzimas citoprotectoras vía señalización Nrf2-ARE juega un papel crucial en la defensa celular a través de la eliminación de electrófilos citotóxicos y ROS (Kensler et al. 2007). Además de proteger frente al estrés oxidativo y electrofílico, se ha demostrado que este factor de transcripción es capaz de responder frente a estímulos inflamatorios, protegiendo así del daño celular y tisular producido durante la respuesta inflamatoria (Chen et al. 2006; Maicas et al. 2011).

1.4.1 Activación del factor de transcripción Nrf2

En condiciones fisiológicas basales, Nrf2 es una proteína inestable que se encuentra localizada en el citoplasma formando un complejo con la proteína Keap-1 (Figura 11) (Itoh et al. 1999). Esta proteína funciona como un regulador negativo de Nrf2, fijándolo al citoplasma mediante su interacción con proteínas citoesqueléticas. Además, Keap-1 regula la ubiquitinación y degradación proteosómica de Nrf2 (Kobayashi et al. 2004; Furukawa y Xiong 2005). En condiciones de estrés oxidativo o electrofílico, Nrf2 se activa y es liberado de su proteína represora Keap-1. Una vez liberado, el factor de transcripción Nrf2 transloca al interior del núcleo, donde forma un heterodímero con una proteína Maf pequeña (sMaf). El dímero Nrf2-sMaf se une a los AREs localizados en la región promotora de una gran variedad de genes con un papel crucial en la defensa celular (Kensler et al. 2007):

1. Enzimas detoxificantes de fase II como NAD(P)H: quinona oxidoreductasa (NQO1), glutatión S transferasa A1 (GSTA1), glutatión peroxidasa (GPx) y glutamato

1. Introducción

cisteína ligasa (GCL), que detoxifican productos químicos endógenos y exógenos a través de reacciones de reducción y conjugación (Nguyen et al. 2003).

2. Enzimas y proteínas antioxidantes como la tiorredoxina y la HO-1 (Alam et al. 1999; He et al. 2001).

Un modelo ampliamente aceptado para explicar la activación y acumulación nuclear de Nrf2 implica la alteración estructural de la proteína Keap-1 mediante oxidación o modificación covalente de cisteínas críticas presentes en Keap-1, tal y como se ilustra en la figura 11. Debido a la presencia de estos grupos sulfhidrilo altamente reactivos en Keap-1, esta proteína se considera un sensor de compuestos electrofílicos y oxidantes. Así pues, bajo condiciones de estrés oxidativo, Keap-1 se oxida formando un puente disulfuro intermolecular (Wakabayashi et al. 2004). Además, el estrés oxidativo/electrofílico puede activar diferentes cinasas, como la proteína cinasa C (PKC), proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) o fosfatidilinositol-3 cinasa (PI3K), que pueden fosforilar este factor de transcripción, favoreciendo la liberación de Nrf2 de Keap-1 y su consecuente translocación al núcleo. Muchos de los compuestos activadores del factor de transcripción Nrf2 pueden interactuar directamente con los grupos sulfhidrilo presentes en los residuos de cisteína de Keap-1, como por ejemplo el sulforafano (Hong et al. 2005).

1. Introducción

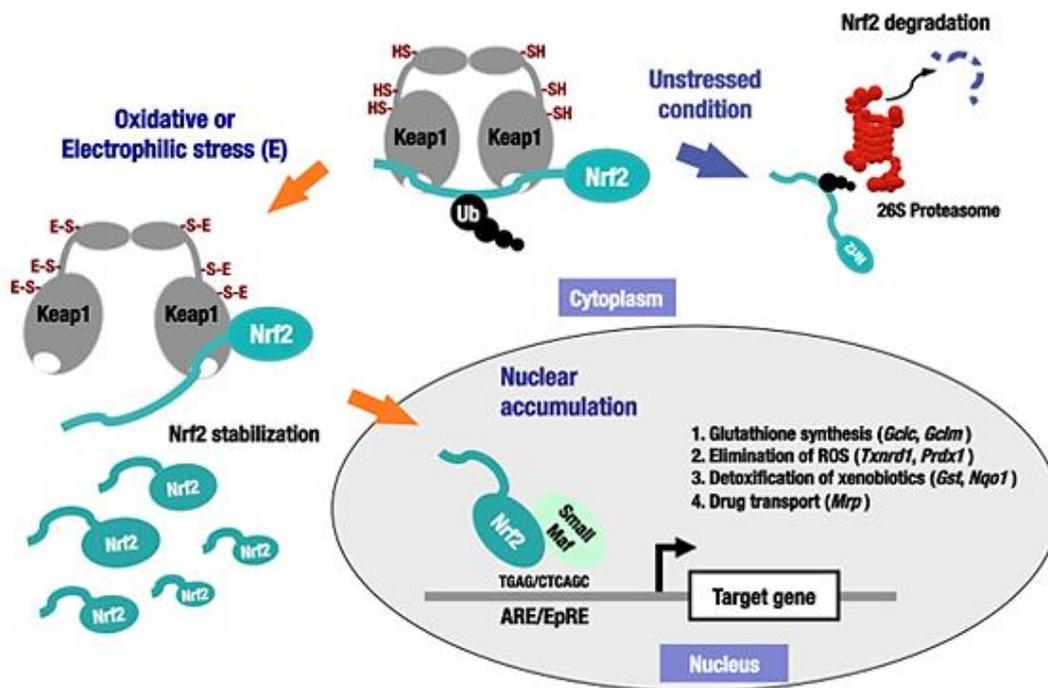


Figura 11. La proteína Keap-1 actúa como un sensor del estrés oxidativo y electrofílico a través de sus residuos de cisteína. Bajo condiciones fisiológicas normales, Keap-1 secuestra el factor de transcripción Nrf2 favoreciendo su degradación proteosómica e impidiendo su translocación al núcleo. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y los electrófilos pueden reaccionar con los grupos sulfhidrilo de residuos críticos de cisteína presentes en la proteína Keap-1 que conlleva la degradación de la misma y la consecuente estabilización y activación de Nrf2. La fosforilación de residuos de serina y treonina presentes en Nrf2 mediada por distintas cinasas, como MAPKs, PI3K y PKC, facilita también la disociación de Nrf2 de Keap-1 y su translocación al núcleo. Una vez en el interior del núcleo, Nrf2 se une a la proteína sMaf y otros factores (ej. co-activador CBP/p300) y activa la expresión de genes que contienen ARE en su región promotora y que protegen frente al daño oxidativo/electrofílico. Además, la activación de Nrf2 puede regular negativamente mediadores proinflamatorios como citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión celular vía regulación de enzimas antiinflamatorias y citoprotectoras como la HO-1 (Mitsuishi et al. 2012).

Por lo tanto, el factor de transcripción Nrf2 juega un papel fundamental en la regulación de la respuesta antioxidante, por lo que la carencia del mismo produce no sólo una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo sino que también agrava la respuesta inflamatoria tisular. De hecho, estudios recientes han demostrado que la vía de señalización Nrf2-ARE está implicada en la atenuación de enfermedades autoinmunes como la AR, y otros procesos inflamatorios, incluyendo artrosis, asma, gastritis, colitis,

1. Introducción

aterosclerosis, Alzheimer y Parkinson (Kim et al. 2010). Nrf2 parece funcionar como un regulador clave en la respuesta antioxidante y antiinflamatoria donde juega un papel fundamental la inducción de la enzima HO-1 mediada por este factor de transcripción.

1.4.2 Regulación de HO-1 vía Nrf2

Entre las enzimas reguladas por el factor de transcripción Nrf2, HO-1 tiene importantes propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y citoprotectoras. La región promotora de esta enzima contiene ARE, por lo que Nrf2 media la expresión de HO-1 en varios tipos celulares (Alam et al. 1999; Rushworth y O'Connell 2004; Song et al. 2009). De hecho, muchos de los efectos debidos a la activación de Nrf2 están mediados por HO-1, ya que los efectos antiinflamatorios y antioxidantes derivados de la activación de este factor de transcripción en distintos tipos celulares son parcialmente bloqueados por el tratamiento con distintos inhibidores de la actividad HO-1, como estaño protoporfirina IX (SnPP) (Lee et al. 2007; Guzman-Beltran et al. 2008; Espada et al. 2010; Jeong et al. 2010; Park et al. 2010) o potenciados y mimetizados por el tratamiento con hemina o cobalto protoporfirina IX (CoPP), activadores de la expresión y actividad de HO-1.

La activación de este factor de transcripción en varios modelos de inflamación *in vitro* e *in vivo*, utilizando compuestos activadores de la vía Nrf2, aumenta la expresión de HO-1 y disminuye la respuesta inflamatoria (Innamorato et al. 2008; Yu et al. 2010). Por el contrario, la ausencia de este factor de transcripción en ratones *knockout* sometidos a distintos estímulos, aumenta la susceptibilidad de los animales al proceso inflamatorio (Osburn et al. 2007), pudiendo disminuir la expresión de HO-1 (Ichihara et al. 2010) y otras enzimas detoxificantes de fase II. Además, estudios *in vitro* demuestran que el CO, metabolito de la actividad HO-1, favorece la translocación y acumulación del factor de transcripción Nrf2 al interior del núcleo (Park et al. 2010).

1.4.3 Grupo hemo

Es un complejo de Fe^{2+} con protoporfirina IX (Figura 12); si el estado de oxidación del hierro es 3+, la molécula se conoce como hemina. El grupo hemo es una molécula esencial para la vida de los organismos aerobios, al servir como grupo prostético de

1. Introducción

numerosas hemoproteínas con funciones biológicas diversas. Asociado a proteínas, el grupo hemo participa en reacciones de óxido reducción, oxigenación, hidroxilación, transporte y almacenamiento de oxígeno, CO y NO.

La función del grupo hemo está determinada por las propiedades de la apoproteína a la que se une (Kumar y Bandyopadhyay 2005). Algunas hemoproteínas son: hemoglobina y mioglobina (transporte de oxígeno), citocromos (transferencia de electrones), las oxidasas, peroxidasas y catalasas (metabolismo del oxígeno), la NOS, la guanilato ciclasa y la NADPH oxidasa.

Cuando el grupo hemo se encuentra libre en altas concentraciones es un pro-oxidante lipofílico que promueve la lipoperoxidación de las membranas lipídicas y organelas tales como mitocondria y núcleo; también desestabiliza el citoesqueleto y proteínas asociadas a membrana, con lo que compromete estructura y transporte. Además, se ha observado que el grupo hemo es capaz de oxidar el ADN mitocondrial y nuclear (Rahman et al. 1997; Suliman et al. 2002).

1.4.4 Hemo oxigenasa

La hemo oxigenasa (HO, EC 1.14.99.3) es la enzima que cataliza el paso limitante de la velocidad de degradación del grupo hemo; sus productos son CO, hierro y biliverdina. En una reacción posterior, la biliverdina reductasa produce bilirrubina a partir de biliverdina (Figura 12) (Maines 1988). La mayor actividad de HO se encuentra en el bazo, aunque se ha detectado en otros tejidos. En mamíferos, se ha descrito la expresión de al menos dos isoformas funcionales de HO codificadas por genes diferentes, cuyas secuencias de aminoácidos son idénticas sólo en un 43% (Maines y Gibbs 2005) y se denominan HO-1 y HO-2. Aunque la reacción que catalizan es esencialmente la misma, estas isoenzimas presentan diferencias en sus características bioquímicas, peso molecular, distribución tisular y regulación génica.

1. Introducción

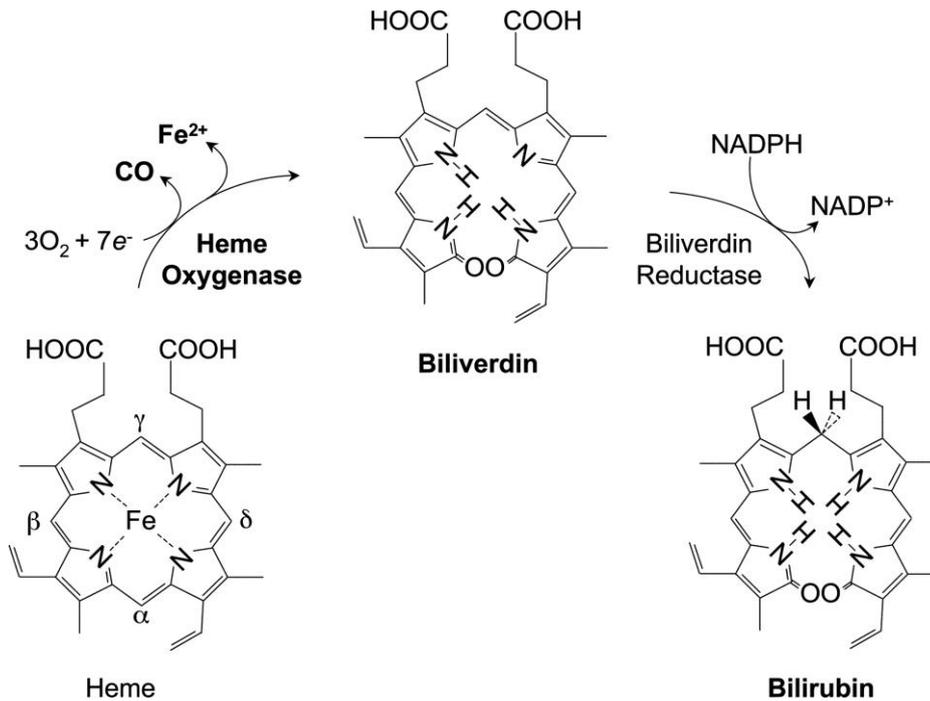


Figura 12. Reacción que cataliza hemo oxigenasa, para degradar el grupo Hemo, generando Fe^{2+} , CO y biliverdina, que más tarde será transformada en bilirubina por acción de la biliverdina reductasa (Ayer et al. 2016).

La primera isoforma de HO en ser identificada fue **HO-1**, que inicialmente se reconoció como una proteína de choque térmico, con un peso molecular de 32 kDa. En condiciones fisiológicas, la expresión de esta enzima sólo ocurre en bazo (Braggins et al. 1986) y en la mayoría de las células no se detecta o es muy baja. En el cerebro, se ha encontrado en poblaciones neuronales del cerebelo, tálamo, hipotálamo, hipocampo, corteza cerebral (Bergeron et al. 1998; Colombrita et al. 2003) y en el endotelio cerebral (Parfenova et al. 2001). Sin embargo, la expresión de la HO-1 se induce principalmente como respuesta a su sustrato, el grupo hemo, y también por una gran variedad de estímulos, entre los que se encuentran fármacos, metales, radiación ultravioleta, hipoxia, hiperoxia, isquemia, H_2O_2 y depleción de glutatión, entre otros. Estos estímulos extracelulares activan la transcripción (síntesis de ARNm) del gen de la HO-1 por medio de los factores AP-1, AP-2, NF- κ B o Nrf2, entre otros (Alam y Cook 2007).

En 1999 se informó de un caso de deficiencia de HO-1 en un niño japonés de 6 años de edad que sufría fiebre recurrente y retraso severo en el crecimiento. Este niño presentó un nivel bajo de bilirrubina sérica (~ 0.3 mg/dl, normal 0.2-1.3) asociado con anemia

1. Introducción

hemolítica persistente y concentraciones muy altas de grupo hemo en plasma (490 μM , cuando normalmente no se detecta o es $<1 \mu\text{M}$), lo que sugería un defecto en el catabolismo del grupo hemo. La secuencia de nucleótidos del gen de HO-1 del paciente reveló la delección del exón 2 en el alelo materno y la delección de dos bases dentro del exón 3 en el alelo paterno. La combinación de estas dos mutaciones resultó en la imposibilidad de sintetizar HO-1 funcional. El paciente también presentó hiperlipidemia, altos niveles de haptoglobina, niveles indetectables de hemopexina, acumulación de hierro en tejido renal y hepático, proteinuria y hematuria persistentes debido al daño tubular renal, hepatomegalia, asplenia y producción excesiva de glóbulos blancos y plaquetas. No se encontró evidencia de anormalidades en el cerebro, a excepción de una hemorragia subdural (Yachie et al. 1999; Kawashima et al. 2002).

La mayoría de estas características también se encontraron en ratones transgénicos deficientes en HO-1, al presentar hepatomegalia, anemia, acumulación de hierro y mayor lipoperoxidación y oxidación de proteínas en hígado y riñón que los ratones normales (Poss y Tonegawa 1997a). Además, estos ratones fueron más sensibles al daño por isquemia y endotoxina que los ratones *naïve*. En conjunto, estos datos sugieren que HO-1 juega un papel esencial en la defensa contra el estrés oxidativo y en el metabolismo del hierro.

La isoforma constitutiva de la HO se denomina **HO-2**, y su expresión se ha detectado predominantemente en cerebro, testículos, endotelio, hígado y la porción distal de la nefrona. Es abundante en el cerebro de una gran variedad de especies, incluyendo ratón, cerdo, rata y humano. Se ha demostrado que tanto en animales recién nacidos como en maduros, la HO-2 se expresa en neuronas (Bidmon et al. 2001) y vasos cerebrales (Parfenova et al. 2001). Otra diferencia entre la HO-1 y la HO-2 radica en que esta última posee dos sitios de unión al grupo hemo independientes del sitio catalítico, por lo que se ha sugerido que esta enzima además de degradar al grupo hemo, podría mantenerlo secuestrado, (McCoubrey et al. 1997) lo que limitaría su disponibilidad para participar en reacciones de oxidación y en formación de hemoproteínas. Además, la capacidad de HO-2 para unirse a moléculas de hemo

1. Introducción

también es importante ya que éste se une con gran afinidad al O₂, NO· y CO, por lo que se ha postulado que la HO-2 controla el nivel de estos gases.

1.4.5 Efecto celular de los productos de la reacción de la HO

En el pasado, los productos de degradación del grupo hemo sólo se consideraban metabolitos tóxicos, debido a que únicamente se conocían sus efectos adversos. Sin embargo, se ha demostrado que uno o más de los productos generados por actividad enzimática de HO como CO, biliverdina o bilirrubina, serían responsables del efecto protector conferido por la enzima. El CO es vasodilatador y antiapoptótico (Ryter y Otterbein 2004) y tanto la biliverdina como la bilirrubina son antioxidantes (Sedlak y Snyder 2004; Stocker 2004). Además, en algunos casos se ha demostrado que el aumento en la actividad de HO-1 induce la salida de hierro de la célula (Baranano et al. 2000) y aumenta la expresión de ferritina, la proteína intracelular de almacenamiento de hierro (Balla et al. 2005; Erdmann et al. 2006), como se describe a continuación.

Fe²⁺: la inducción de la HO-1 tiene como resultado el aumento en la cantidad de Fe²⁺ al ser liberado del grupo hemo. Este metal cataliza la producción de ROS mediante la reacción de Fenton. Sin embargo, en varios casos se ha demostrado que la inducción de HO-1 se acompaña de un aumento en la expresión de ferritina (Grosser et al. 2004), proteína intracelular de alto peso molecular que almacena el hierro celular que se encuentre en exceso. También, se ha observado que al inhibir la expresión de la HO disminuye la expresión de ferritina (Erdmann et al. 2006). Esto es, la inducción de la HO-1 se encuentra acompañada de un mecanismo que impide que el Fe²⁺ participe en la generación de ROS. Además, se ha comprobado que la sobreexpresión de HO-1 acelera el flujo de hierro, al promover mayor actividad de la ATPasa que disminuye el nivel intracelular de hierro (Baranano et al. 2000). Lo anterior es consistente con la acumulación de hierro en ratones deficientes en HO-1, y con la disminución en el flujo de hierro que se da cuando se inhibe la actividad de la HO-1. No se conoce si el incremento de ferritina y actividad de la ATPasa de hierro contribuye al efecto citoprotector global de la HO-1, pero se ha sugerido que ambos mecanismos participan de forma crucial en el efecto antioxidante global que se obtiene como resultado del incremento de la expresión de la HO-1.

1. Introducción

CO: Durante mucho tiempo, el CO se ha considerado un gas tóxico y peligroso, pero recientemente, el CO ha atraído la atención ya que se ha demostrado que se trata de un neuromodulador con efectos similares a los del NO y también tiene funciones antiapoptóticas antiinflamatorias y es un vasodilatador (Basuroy et al. 2006; Parfenova et al. 2006; Harder et al. 2008). Se ha demostrado que el CO modula la regulación del tono de los vasos *in vitro* y la presión sanguínea *in vivo* (Ndisang et al. 2004).

La unión del CO a la guanilato ciclasa soluble (GCs) activa a esta enzima (Olson y Donald 2009), estimulando la producción de guanosina-3,5-monofosfato cíclico (GMPc). Se ha encontrado que la vía GCs/GMPc actúa mediando los efectos del CO en numerosos modelos, incluyendo el trasplante de órganos, inflamación pulmonar, hepatitis, daño por isquemia/reperfusión y daño vascular (Ryter y Otterbein 2004). Por tanto, se ha sugerido que el efecto citoprotector que confiere la HO se debe, en parte, a la producción de CO.

Biliverdina y Bilirrubina: la bilirrubina es un pigmento amarillo y lipofílico, que puede resultar potencialmente tóxico en altas concentraciones (>3mg/dL en suero humano). No obstante, parece ser uno de los antioxidantes endógenos más abundantes en mamíferos, y es el compuesto con mayor actividad antioxidante en el suero humano. Al igual que la biliverdina, este compuesto posee una potente actividad atrapadora de ROS, incluyendo O₂, radical peroxilo y peroxinitrito (Stocker 2004; Mancuso et al. 2006). Cuando la concentración de bilirrubina en tejido es baja (20-50 nM), la bilirrubina entra en un ciclo de amplificación, siendo oxidada a biliverdina y luego reciclada por la biliverdina reductasa nuevamente a bilirrubina, con lo que la concentración efectiva de bilirrubina se mantiene. Este ciclo explica el potencial antioxidante de la bilirrubina, más allá de la estequiometría 1:1, y su importancia fisiológica al atrapar ROS. Por tanto, es razonable pensar que la capacidad antioxidante de la bilirrubina pueda participar en el efecto antiapoptótico de HO-1.

Como varios de los estímulos que inducen la expresión de HO-1 son pro-oxidantes y se ha encontrado evidencia de que la inducción de HO-1 proporciona un efecto protector en modelos *in vitro* e *in vivo* asociados al estrés oxidativo, se ha considerado que la

activación del gen de HO-1 representa un mecanismo de defensa celular (Cuadrado y Rojo 2008; Schipper et al. 2009).

1.4.6 HO-1 en la AR

En la AR existe una fuerte expresión de HO-1 en fibroblastos y macrófagos sinoviales (Zwerina et al. 2005; Zwerina et al. 2005). Es probable que la presencia de estrés oxidativo o nitrosativo, citocinas o hipoxia en estas células induzca la expresión de HO-1. Por otro lado, los tratamientos de la AR pueden aumentar la expresión de esta enzima, lo que podría contribuir a la atenuación del proceso inflamatorio. Así, el tratamiento con Infliximab aumenta los niveles de ARNm de HO-1 y reduce la síntesis de TNF α en células mononucleares de sangre periférica (Kirino et al. 2007).

Se ha identificado el polimorfismo HO-1 (GT) (n) como un nuevo marcador genético en la AR (Rueda et al. 2007). Es interesante señalar que las personas con el genotipo SS, que está ligado a una inducción mayor de HO-1 tienen una evolución radiológica mejor frente a los que poseen el genotipo LL (Wagener et al. 2008).

En trabajos anteriores, nuestro grupo de investigación ha venido estudiando los efectos de la inducción de HO-1 y de su inhibición sobre diversos procesos inflamatorios. Dentro de esta línea, se ha demostrado que la inducción de HO-1 o la administración de compuestos dadores de CO, como CORM-3 tiene efectos antiinflamatorios en modelos de AR (Devesa et al. 2005; Ferrandiz et al. 2008; Maicas et al. 2010; Ibanez et al. 2012). En el modelo de CIA, la inducción de HO-1 fue efectiva para prevenir el desarrollo de la enfermedad, con una infiltración celular reducida y una menor exudación en el espacio articular, que determinó una protección parcial frente a la erosión del cartílago y la muerte de los condrocitos. Además, la administración de CORM-3 inhibió la producción de IL-1 β TNF α , IL-6, y PGE $_2$ produciendo una reducción significativa del proceso artrítico. En este modelo experimental, se estudió también el efecto de un fármaco inhibidor de HO-1 (SnPP), que de forma inesperada demostró un efecto antiartrítico y redujo la producción de IL-1 β y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Como consecuencia de dichos trabajos, se puede deducir que la utilización de los fármacos inhibidores de HO-1 disponibles en la actualidad presenta numerosos

1. Introducción

problemas, como la falta de selectividad hacia esta enzima o la posible inducción de HO-1 en algunos casos, por lo que no son adecuados para determinar las consecuencias de la inhibición de HO-1. Por el contrario, los ratones *knockout* en HO-1 son una herramienta biológica de gran valor para estudiar el papel de HO-1 en los procesos inflamatorios implicados en la AR.

Objetivos

2. Objetivos

Los datos existentes han demostrado el interés que tiene la regulación de la HO-1 para el control de los procesos inflamatorios, tanto agudos como crónicos. Los resultados previos obtenidos en modelos animales de AR han indicado la necesidad de disponer de herramientas específicas para estudiar las consecuencias de la inhibición de HO-1. En este sentido, los ratones modificados genéticamente pueden ser de gran utilidad para lograr establecer los efectos que determinan la delección de HO-1 y los mecanismos implicados.

Por otro lado, es necesario disponer de modelos experimentales que reproduzcan los diversos aspectos fisiopatológicos de la AR y que sean convenientes para su aplicación al estudio de nuevas estrategias reguladoras, así como a la utilización de animales modificados genéticamente.

Por todo ello, la presente tesis se ha centrado en los siguientes objetivos:

1.- Caracterizar el modelo de artritis por transferencia de suero K/BxN para conocer mejor la evolución del proceso y los mediadores implicados, así como su posible aplicación como modelo de artritis en fase crónica en ratones transgénicos.

2.- Determinar las consecuencias de la delección de HO-1 en la inflamación experimental y especialmente, en el modelo de artritis por transferencia de suero K/BxN. Para ello, hemos utilizado:

- Ratones HO-1 *knockout* homocigotos y heterocigotos.
- Ratones HO-1 *knockout* condicional en la línea mieloide, basados en el sistema de recombinación Cre/loxP.

Material y métodos

3. Material y métodos

3.1 MÉTODOS DE ESTUDIO *IN VIVO*

Todos los estudios *in vivo* se realizaron de acuerdo con la normativa de la Unión Europea sobre el manejo y uso de animales de laboratorio. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la Universidad de Valencia (ver Anexos, apartado 8.2). Los animales se mantuvieron en un ambiente controlado con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas a una temperatura constante de 22°C. Los animales fueron cuidados y rutinariamente evaluados por los veterinarios y por el personal acreditado del animalario. Todos los ratones fueron provistos de una dieta estándar y agua *ad libitum*.

3.1.1 Animales utilizados en los modelos *in vivo*:

a) Ratones C57BL/6

Ratones macho C57BL/6 (Janvier, Le Genest St Isle, Francia) de 20-25 gramos de peso y de entre 10 y 12 semanas de edad.

b) Ratones HO-1^{+/+}, HO-1^{+/-} y HO-1^{-/-}

Ratones de 20-27 semanas de edad, machos C57BL/6xFVB (HO-1^{+/+}, HO-1^{+/-} y HO-1^{-/-}), ratones generados a partir de la pareja reproductora HO-1^{+/-} amablemente cedida por el Dr. Anupam Agarwal (Birmingham, AL, EEUU). Su peso estaba comprendido entre 26 y 28 gramos. Los ratones fueron genotipados tres semanas después del nacimiento por PCR utilizando ADN de la cola en la Jagiellonian University, Krakow (Poland).

c) Ratones HO-1 *Knockout* condicionales

Ratones C57BL/6 modificados genéticamente para no expresar la enzima HO-1 únicamente en las células provenientes de la línea mieloide (monocitos y macrófagos, granulocitos, células dendríticas, eritrocitos y plaquetas), denominados también como ratones HO-1 *knockout* condicionales. De esta forma conseguimos que estas células no expresen HO-1, pero el resto del organismo mantiene su expresión, sin alterar el funcionamiento de ningún órgano. Focalizamos así el estudio de la implicación de HO-1 en la respuesta inmune durante los procesos inflamatorios. A este genotipo lo nombramos como HO-1^{KO-M}.

3. Material y métodos

Para generar este tipo de animales, se emplea el sistema de recombinación Cre/*loxP*. El sistema Cre-*loxP* es la estrategia más utilizada en la mutagénesis dirigida, específica de tejido. La colocación y orientación de los sitios *loxP* (que se introducen en la secuencia de ADN a recombinar) determinarán la secuencia genómica a escindir, mientras que la disponibilidad de la recombinasa Cre, que se obtiene a partir de un transgen, dictará cuándo y dónde se produce la recombinación y, por tanto, la deleción (Schwenk et al. 1995).

En este caso en concreto, los ratones condicionales en HO-1 para la línea mieloide se generaron cruzando ratones *Hmox1*^{FL/FL} con ratones *LysM-Cre knockin*. El transgen *LysM-Cre* dirige la deleción de las secuencias del gen flanqueadas por *loxP* (las regiones que codifican para HO-1) en macrófagos y granulocitos (Clausen et al. 1999; Tzima et al. 2009). Se emplearon tanto machos como hembras de 20-25 gramos de peso y de entre 10-12 semanas de edad.

Los ratones *Hmox1*^{FL/FL} (129.B6-Hmox1tm1.1Gkl/Flmg EM: 10935) fueron proporcionados por el Dr. George Kollias (Alexander Fleming Biomedical Sciences Research Centre, Vari, Grecia), y los ratones *LysM-Cre* (B6.129P2-Lyz2tm1 (cre) lfo/CgnCnrm EM:01145) fueron proporcionados por EMMA (European Mouse Mutant Archive) Repository, Istituto Biologia Cellulare CNR, Monterotondo Scalo, Italia, y procedían originalmente de MGC Stiftung (Mouse Genetics Cologne (MGC) Foundation, Munich, Alemania).

El genotipado de los ratones se realizó a partir de una muestra de la cola, utilizando el kit "KAPA Mouse Genotyping Kit" (KAPABiosystems, Boston, EE.UU.). La muestra se lisó en el tampón de lisis del kit, que contiene una proteasa termoestable, a 75°C durante 10 min. Posteriormente se inactivó la enzima (95° durante 5 min), se centrifugó (3.000 rpm, 1 min) y el sobrenadante se diluyó 1/10 para utilizarlo en la reacción de PCR. El extracto (1 µl) se amplificó utilizando "KAPA2G Fast Genotyping Mix" que contiene ADN polimerasa, tampón KAPA 2G, dNTPs (0,2 mM) y MgCl₂ (1,5 mM), a los que se añadieron los cebadores (10 µM): HO-1 (F 5'-AGGGGAAGAAGACTCATCGA-3', R 5'-AGAAGGCTCGGAGGTAAAT-3'), *LysM-Cre* (F 5'-CGAGTGATGAGGTTTCGCAAG-3', R 5'-

3. Material y métodos

TGAGTGAACGAACCTGGTTCG-3') o LysM-WT (F 5'-GCATTGCAGACTAGCTAAAGGCAG-3', R 5'-GTCGGCCAGGCTGACTCCATAG-3'). La reacción de PCR se realizó para Hmox1: 1 ciclo de 4 min a 94°C; 1 ciclo de 45 sg a 52°C; 30 ciclos de: 45 sg a 93°C, 45 sg a 52°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C. Para Cre: 1 ciclo de 2 min a 95°C; 45 ciclos de: 30 sg a 95°C, 30 sg a 58°C, 90 sg a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C. El producto resultante de la PCR se analizó con un Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies Spain, Madrid). La banda correspondiente al alelo Hmox1FL aparece a 545 pb, Hmox1-WT a 387 pb, LysM-Cre a 390 pb y LysM-WT a 428 pb.

3.1.2 Estudios en el modelo de artritis por transferencia de suero K/BxN

3.1.2.1 Material

Para el desarrollo de este modelo experimental de artritis, es necesario el suero que se obtiene a partir de ratones K/BxN espontáneamente artríticos (Rheum. Res. Adv. Therap. Radboud University Nijmegen Medical Center, Holanda). Estos ratones K/BxN, que desarrollan de manera espontánea la enfermedad, se obtuvieron cruzando ratones KRN TCR-transgénicos (B10.BR genetic background) con ratones NOD (non obese diabetic) (ver Introducción, apartado 1.2.2).

3.1.2.2 Protocolo experimental clásico

Para inducir el proceso artrítico a los ratones C57BL/6, se les administra el suero anteriormente descrito, proveniente de ratones K/BxN espontáneamente artríticos. El día 0 se lleva a cabo la primera inmunización con 150 µl de suero por vía intraperitoneal. El día 2 se realiza la segunda inmunización con el mismo volumen de suero (figura 13). Los animales desarrollaron rápidamente el proceso artrítico con un grado variable de inflamación en sus extremidades, destacando principalmente la hinchazón producida en los tobillos y en las patas delanteras.

3. Material y métodos

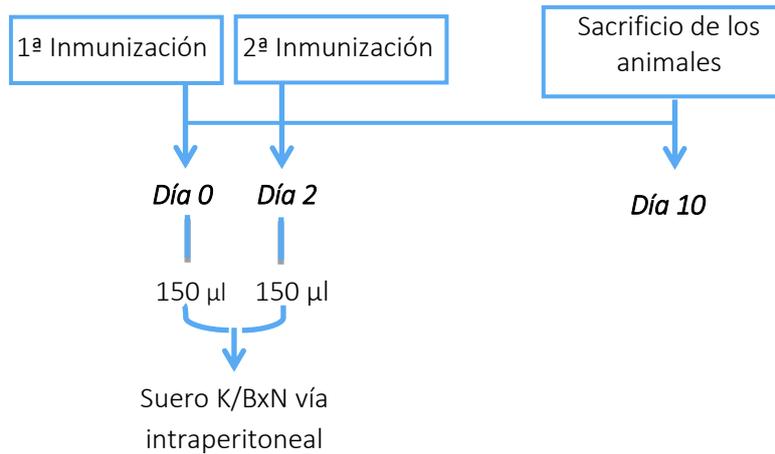


Figura 13. Protocolo experimental clásico para inducir el proceso artrítico a los ratones mediante el método de transferencia de suero proveniente de ratones K/BxN.

La severidad clínica de la artritis la evaluamos macroscópicamente utilizando la escala mostrada en la tabla 1. La puntuación se lleva a cabo por varios observadores independientes sin conocimiento de los grupos experimentales. Finalmente el día 10 sacrificamos todos los ratones.

Puntuación	Descripción
0,25	1-2 dedos inflamados
0,5	3-4 dedos inflamados/muñeca, palma o tobillo ligeramente inflamado
0,75	Muñeca, palma o tobillo notablemente inflamado
1	Muñeca o tobillo muy inflamado
1,25	Muñeca, tobillo y dedos ligeramente inflamados
1,5	Muñeca, tobillo y dedos notablemente inflamados
1,75	Muñeca, tobillo y dedos muy inflamados
2	Muñeca, tobillo y todos los dedos muy inflamados/deformidad de las patas

Tabla 1. La valoración de la artritis se realiza puntuando la inflamación de cada pata según las partes afectadas.

3.1.2.3 Protocolo experimental modificado: resolución y cronificación del modelo

Realizamos una adaptación del modelo original de artritis por transferencia de suero K/BxN para alargar el proceso artrítico y estudiar la evolución del mismo en un modelo de artritis más prolongado en el tiempo.

3. Material y métodos

Los ratones macho C57BL/6 se dividieron en cinco grupos, por un lado, los grupos *naïve* 1 (n=6) y control (n=10), y por otro lado los grupos *naïve* 2 (n=6), resolución (n=8) y crónico (n=9). A los grupos *naïve* no se les indujo el proceso artrítico, al administrarles suero fisiológico en lugar del suero K/BxN.

Para el grupo control la artritis se indujo según el protocolo estándar indicado en la figura 13. El experimento se alargó para los grupos *naïve* 2, resolución y crónico. El grupo crónico fue reinmunizado a días 9, 16 y 23 con 100 µL de suero K/BxN, mientras que a los grupos *naïve* 2 y resolución, se les administró el mismo volumen de suero fisiológico (SF). Los grupos *naïve* 2, resolución y crónico fueron sacrificados a día 30 (Figura 14).

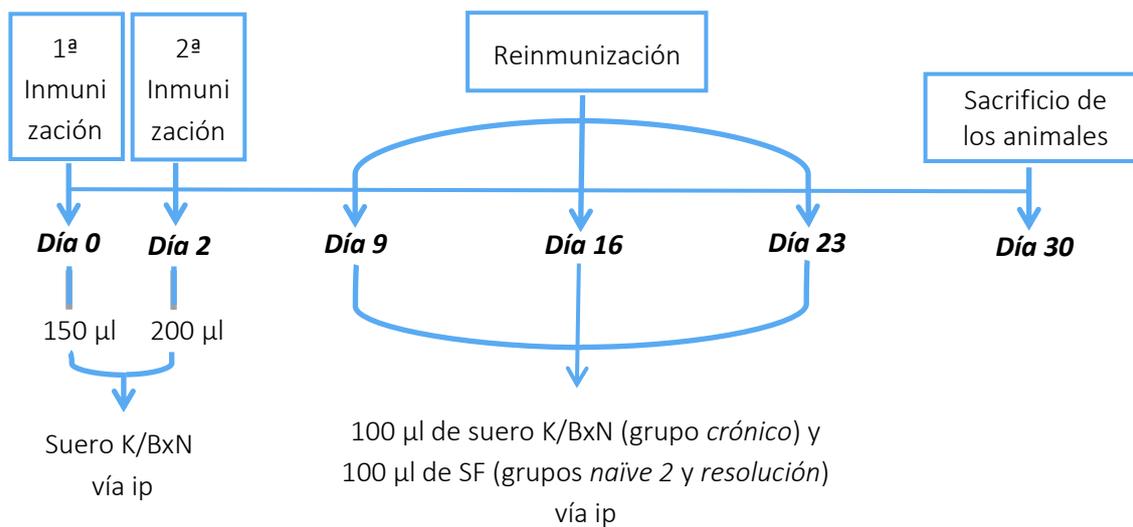


Figura 14. Protocolo experimental modificado.

En este caso, al evaluar macroscópicamente al grupo de resolución y crónico, se consideró además del edema y la inflamación de la articulación, la deformación en dedos y en el tobillo. A medida que se alarga el proceso artrítico la inflamación disminuye dando lugar a la deformación de la pata, tal y como sucede en los pacientes que sufren artritis reumatoide.

3. Material y métodos

3.1.2.4 Obtención y procesamiento de las muestras

La obtención y el procesamiento de las muestras son comunes para los distintos experimentos realizados mediante los modelos de artritis por transferencia de suero K/BxN.

Durante el proceso artrítico se extrajo sangre de los animales, previamente anestesiados, del plexo retroorbital, a diferentes tiempos (dependiendo del experimento) y a tiempo final.

En una muestra de sangre extraída a día 9 se determinaron los siguientes parámetros: recuento de glóbulos blancos, glóbulos rojos, concentración de hemoglobina, hematocrito, el volumen plaquetario medio, el volumen corpuscular medio, que hace referencia a la media del volumen individual de los eritrocitos, la hemoglobina corpuscular media, que es una medida de la masa de la hemoglobina contenida en un glóbulo rojo, y el recuento de plaquetas, linfocitos, monocitos y granulocitos. Estos parámetros se determinaron con un procesador automático de sangre (Scil Vet ABC HORIBA ABX., UK).

Tras finalizar el proceso artrítico, se sacrificaron los animales mediante dislocación cervical y se extrajeron las patas de los ratones. Las patas traseras y delanteras se congelaron a -80°C para su posterior homogeneización en N_2 líquido o se fijaron en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS) (pH 7,4) para realizar posteriormente el estudio histológico e inmunohistoquímico de la articulación (ver Material y métodos, apartados 3.1.4.1 y 3.1.4.2).

Una vez pulverizada la muestra en N_2 líquido, se introdujo en un tubo de ensayo y se añadió la cantidad adecuada de Tampón A (tabla 2). Se utilizó 1 ml para cada pata delantera y el tobillo y 1,5 ml para la pata trasera completa (rodilla y tobillo). Tras sonicar a 4°C en 3 ciclos de 10 segundos, se incubaron las muestras 10 minutos a 4°C . A continuación, se centrifugó el homogeneizado obtenido a 2.500 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C . El sobrenadante se utilizó tanto para la determinación de mediadores mediante ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) y radioinmunoensayo (RIA), como para el análisis de la expresión proteica mediante Western Blot (esquema 1).

3. Material y métodos

- *Tampón A con Inhibidores de proteasas (para 10 ml): 100 µl de HEPES (Ácido N-[2-hidroxiethyl]piperazina-N'-[2-etanosulfónico]) 1M (pH 8), 100 µl de EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) 0,1M, 1000 µl de EGTA (Ácido etilenglicol-bis[β-aminoetileter]-N, N, N', N'-tetraacético) 0,01M, 100 µl de KCl 1M, 10 µl de DTT (ditiotreitól) 1mM, 100 µl de NaF 5mM, 20 µl de Na₃VO₄ 1mM, 10 µl de leupeptina (1 µg/ml), 10 µl de aprotinina (0,1 µg/ml), 25 µl de PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 0,5 mM y 8,7 ml de agua destilada. pH 8, 0*

SOLUCIÓN MADRE		INHIBIDORES DE PROTEASAS	
Composición	Cantidad para 10 ml	Composición	Cantidad para 10 ml
HEPES 1M	100 µl	DTT (1mM)	10 µL
EDTA 0,1M	100 µl	NaF (5mM)	100 µL
EGTA 0,01M	1 ml	Na ₃ VO ₄ (1mM)	20 µL
KCl 1M	100 µl	Leupeptina (1µg/ml)	10 µL
H ₂ O destilada	8,7 ml	Aprotinina (0,1 µg/ml)	10 µL
		PMSF (0,5mM)	25 µL

Tabla 2. Composición del tampón A para 10 ml.

Además en algunos experimentos, se extrajeron células de la médula ósea del fémur y la tibia para realizar los estudios de estrés oxidativo y osteoclastogénesis (ver Material y métodos, apartado 3.2.2)

También se obtuvieron los macrófagos peritoneales de algunos de los ratones para su posterior tinción y caracterización de la expresión de HO-1 (Material y métodos apartado 3.2.1).

La sangre recogida del plexo retroorbital se introdujo en tubos SSTTM (BD Microtainer®) y se dejó reposar durante media hora a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugó a 15000g, durante 15 minutos a 4°C y se recogió el sobrenadante para la determinación sérica de distintos mediadores.

3. Material y métodos



Esquema 1. Esquema del protocolo de trabajo.

3.1.3 Modelo de inflamación aguda: Bolsa de aire en ratón

Este modelo experimental constituye un método muy útil y sencillo para el estudio de mediadores implicados en la fase aguda de la inflamación.

El modelo de bolsa de aire fue descrito inicialmente por (Edwards et al. 1981) utilizando como animal de experimentación la rata. Posteriormente, se adaptó para desarrollarlo en ratón (Dawson et al. 1991). Está basado en la formación de una cavidad subcutánea en el dorso del animal tras la inyección de aire estéril. La “bolsa” generada puede utilizarse como una cámara de cultivo celular en la que se pueden inyectar diferentes agentes irritantes y estudiar sus efectos en la morfología celular, actividad enzimática, producción de mediadores de la inflamación, etc. (imagen 1).

3. Material y métodos

La cavidad formada es muy similar a la membrana sinovial y se caracteriza por la formación de una superficie celular bien organizada donde se encuentran células tipo A semejantes a macrófagos y células tipo B (fibroblastos), así como una barrera mecánica que retiene tanto al agente irritante como los productos liberados característicos de la respuesta inflamatoria.

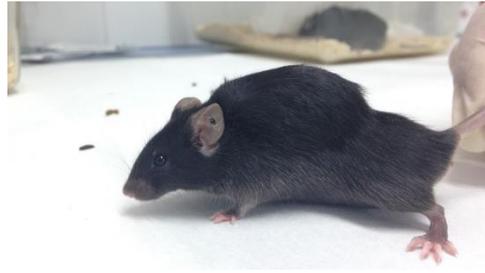


Imagen 1. Fotografía de un ratón C57BL/6 al que se le ha realizado la bolsa de aire en el espacio subcutáneo de la zona dorsal.

En la literatura se han descrito diferentes agentes irritantes que pueden ser empleados. El zimósán es uno de los más comunes porque produce una intensa infiltración de PMNs en el fluido de la bolsa y a su vez es capaz de activar el complemento e inducir la secreción de enzimas lisosomales y la producción de prostaglandinas y leucotrienos (Konno y Tsurufuji 1983; Konno y Tsurufuji 1985).

Este modelo se ha utilizado para comparar la respuesta inflamatoria aguda producida en los ratones HO-1^{M-KO} y C57BL/6, analizando como parámetros inflamatorios la infiltración leucocitaria, los niveles de mediadores en el exudado de la bolsa y la expresión proteica en las células infiltradas.

Debido a que no se había estudiado nunca este modelo en ratones HO-1^{M-KO}, realizamos un primer análisis para determinar qué condiciones serían las idóneas para desarrollar este estudio.

3.1.3.1 Material y animales

En el estudio preliminar seleccionamos ratones macho C57BL/6 de 20-25 gramos de peso y de entre 10 y 12 semanas de edad. Posteriormente, los animales utilizados fueron los ratones macho C57BL/6 (*Janvier, Le Genest St Isle, Francia*) y ratones *Knockout* condicionales para HO-1 en las células de la línea mieloide (HO-1^{M-KO}) tanto machos como hembras de 20-25 gramos de peso y de entre 10 y 12 semanas de edad (Ver material y métodos, apartado 3.1.1).

3. Material y métodos

3.1.3.2 Protocolo experimental

El método utilizado se basa en el descrito por Edwards et al. 1981 con algunas modificaciones. Inicialmente inyectamos en el dorso de los animales un volumen de 10 ml de aire estéril, que debe permanecer en la capa subcutánea de la piel para producir la bolsa. Tres días después reinflamos la bolsa inyectando 5 ml de aire estéril. Al sexto día de la inyección inicial, administramos en el interior de la bolsa, el agente irritante, el zimósán 1%.

Al grupo control le administramos en la bolsa de aire 1 ml de zimósán 1% estéril en solución salina mientras que al grupo “sano” le inyectamos el mismo volumen de suero fisiológico estéril.

En el estudio preliminar sacrificamos los animales a diferentes tiempos (8h, 24h y 48h tras la administración de zimósán 1%) para determinar cuál era el momento idóneo para sacrificar al animal en función de los mediadores inflamatorios que pretendíamos analizar posteriormente (Figura 15).

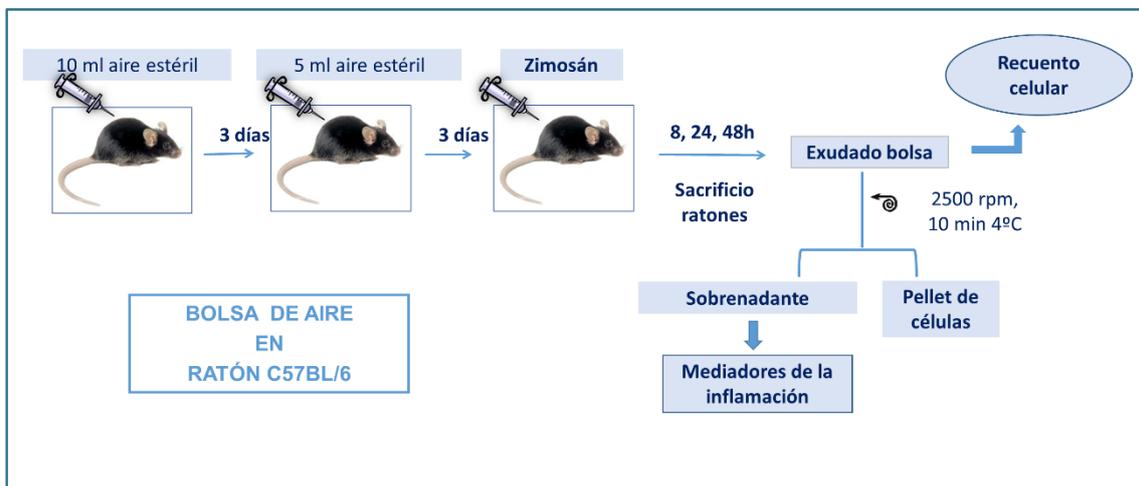


Figura 15. Esquema del protocolo seguido para el desarrollo de la bolsa el aire en el dorso del animal

Tras realizar un estudio de la migración celular, la liberación de mediadores (IL-1 β , TNF α , CXCL-1, PGE $_2$, IL-10 y niveles de nitrito) y la expresión de la proteína HO-1 en las células del exudado de la bolsa de aire, observamos que el tiempo que más información nos aportaba estaba situado entre las 8h y 24h, tras la administración de zimósán. Por

3. Material y métodos

ello, seleccionamos el tiempo de 18h después de administrar zimosán 1% como el momento idóneo para sacrificar a los animales en nuestros experimentos posteriores con ratones HO-1^{M-KO}.

Por tanto, trascurridas 18 horas tras inyectar el agente irritante, extrajimos sangre a los animales del plexo retroorbital, los sacrificamos por dislocación cervical y obtuvimos el exudado de la bolsa de aire.

3.1.3.3 Obtención y procesamiento de las muestras.

A partir de la sangre extraída de los ratones, obtenemos el suero por centrifugación.

Se recoge el exudado de la bolsa con ayuda de una jeringuilla y se cuantifica la migración celular con un aparato de contaje (Beckman coulter™, Z2 Coulter®). Posteriormente se centrifuga a 1300g 5 minutos a 4°C, de esta manera separamos por un lado el sobrenadante, en el cual determinaremos los niveles de IL-1β, TNFα, CXCL-1, MMP-3 y PGE₂ mediante técnicas de ELISA y RIA (ver Material y métodos apartados 3.1.4.3 a y d) y por otro lado obtenemos el pellet donde se encuentran las células. En estas células mediremos la expresión de HO-1 por *Western Blot* (ver Material y métodos apartado 3.1.4.3 g).

Además, extrajimos los macrófagos peritoneales residentes en estos ratones, para confirmar la falta de expresión de HO-1 en las células de la línea mieloide, mediante inmunofluorescencia (ver Material y métodos 3.2.1).

3.1.4 Análisis de las muestras

3.1.4.1 Análisis histológico

El estudio histológico se llevó a cabo en las articulaciones de aquellos animales sometidos al proceso artrítico para estudiar la afectación de las mismas.

a) Descalcificación de las muestras

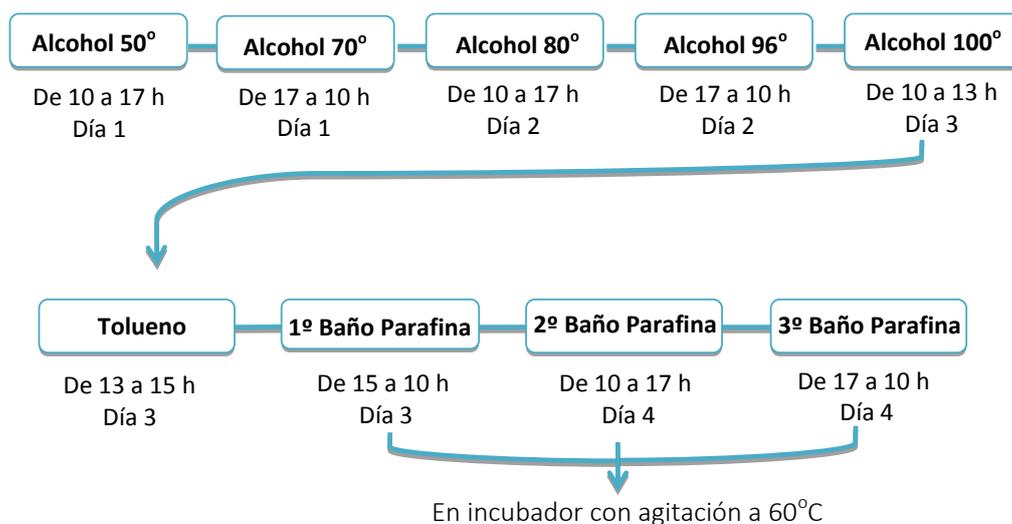
Una vez sacrificados los animales a los que indujimos la artritis, se obtuvieron las articulaciones seleccionadas y se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7,4)

3. Material y métodos

durante al menos 4 días. A continuación, se realizó la descalcificación de las muestras con EDTA 10% (Sigma) durante 21 días, almacenando las muestras en cámara fría a 4°C con agitación y renovando el EDTA cada semana. Otra forma de descalcificar las muestras es hacerlo en ácido fórmico al 5% en agua destilada (pH 7,4) durante 1 semana, en agitación y a temperatura ambiente (renovando el descalcificante a los 3 o 4 días). Se escoge una forma u otra en función del tipo de tratamiento que se dará luego a las muestras. Las patas destinadas a inmunohistoquímica o a tinción con hematoxilina/eosina (H/E) se descalcifican con EDTA, que es un quelante químico que se combina con los iones metálicos formando compuestos solubles en agua. El EDTA sustrae calcio de una forma muy lenta sin alterar la composición ni estructura proteica del tejido. El ácido fórmico, que es un ácido relativamente fuerte, es más rápido como descalcificante, pero también más agresivo para la muestra. Lo usaremos principalmente para las tinciones con safranina O y *fast green*.

b) Deshidratación de tobillos

Una vez descalcificadas las muestras, se realizó un lavado en agua ultrapura y se continuó con el procesamiento de las mismas hasta su completa deshidratación e inclusión en parafina (Lens et al. 1984). Para realizar la deshidratación de las patas se utilizó el protocolo descrito a continuación:



Esquema 2. Esquema de deshidratación de las muestras

3. Material y métodos

c) Inclusión en parafina, cortes, montaje y tinción de las muestras

Una vez deshidratadas las muestras se procedió a su orientación e inclusión en parafina utilizando un dispensador de parafina (*Tissue embedding System TES 99*, Medizintechnik, Nunningen, Suiza). Una vez enfriados los bloques, se realizaron los cortes de las muestras empleando un microtomo Leica RM 2255 (*Leica Biosystems*; Nussloch, Alemania). Se realizaron cortes de 7 μm de espesor. En el caso de los tobillos, se empezaron a recoger los cortes desde la aparición del calcáneo. Las patas delanteras comenzaron a recogerse desde la aparición de los huesos pequeños de la muñeca. Seguidamente, se realizó el montaje de los cortes y la extensión de los mismos con agua destilada empleando una placa calefactora a 39-41°C. En cada porta SuperFrost® Plus (Menzel-Gläser) se realizó un montaje progresivo de 5-6 cortes histológicos por ratón, a distintas profundidades de la articulación (figura 16).



Figura 16. Recogida de cortes parafinados de 7 μm de tobillo de ratón y montaje en portas en placa calefactora.

Los cortes se dejaron secar un mínimo de 2 días en la estufa a 37 °C.

Las secciones obtenidas de 7 μm se desparafinaron con xileno y se rehidrataron con un gradiente decreciente de etanol de acuerdo con el siguiente protocolo:

- Xileno – 5 minutos
- Xileno – 5 minutos
- Etanol absoluto – 5 minutos
- Etanol 96% – 5 minutos
- Etanol 70% – 5 minutos
- Agua destilada

3. Material y métodos

A continuación, los cortes se tiñeron con dos tipos de tinción:

✧ **Hematoxilina de Gill y eosina acuosa (H/E)** (Panreac, Barcelona, España) para la tinción celular. La hematoxilina tiñe el núcleo celular y la eosina el citoplasma.

- Hematoxilina – 10 minutos
- Lavados en agua del grifo – 10 minutos
- Eosina acuosa al 1% – 45 segundos

✧ **Safranina O y fast green** (Sigma) para la visualización del cartílago. La safranina tiñe de rojo el cartílago y las zonas de crecimiento. El *fast green* tiñe de azul verdoso el tejido óseo.

- Enjuague en agua ultrapura
- Safranina O 0,1% en agua ultrapura – 10 minutos
- Enjuague en agua ultrapura
- *Fast green* 0,1% en agua ultrapura – 10 minutos

Los portas se montaron con medio de montaje acuoso (Dako, Copenhague, Dinamarca) y se observaron en un microscopio Nikon Eclipse E600FN (Nikon Instruments).

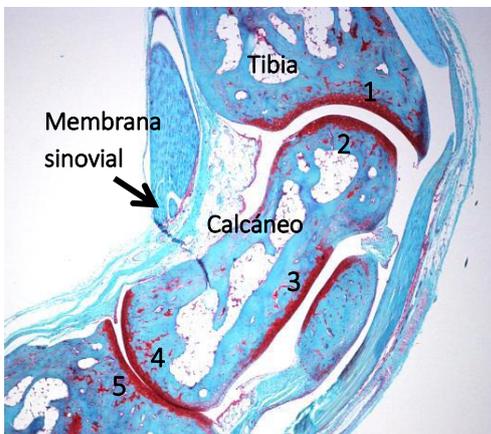


Figura 17. Estructura de la articulación del tobillo. (Tinción safranina O-fast green) Aumento x40. Vemos en rojo el cartílago articular que recubre las zonas de contacto entre los huesos.

En la figura 17 se puede observar la estructura teñida de los cortes histológicos del tobillo.

Los cambios histopatológicos de las articulaciones fueron evaluados en 3 secciones semiseriadas de cada articulación, espaciadas 70 μm y teñidas con hematoxilina-eosina o safranina O y *fast green*. En el caso del tobillo se analizaron 5 zonas distintas de la articulación (figura 17, números 1-5), utilizando una puntuación máxima de 3 (0,6 en cada zona).

3. Material y métodos

d) Parámetros para la evaluación histológica de la articulación

La **pérdida de proteoglicano** se evaluó en las secciones teñidas con safranina O (que se une a los puentes disulfuro de los componentes de la matriz extracelular del cartílago). El proteoglicano es un componente de la matriz extracelular del cartílago (ver Introducción, apartado 1.1.3.2). Durante el proceso artrítico, los condrocitos pierden su capacidad para producir esta matriz extracelular por lo que existe una menor unión de la safranina, produciéndose una progresiva pérdida de coloración: rojo-anaranjado-azul (figura 18). La pérdida de proteoglicano se evaluó utilizando una escala de 0-3, donde 0= una tinción completa del cartílago (figura 18A) y 3= no tinción (figura 18B) o pérdida completa de la capa externa del cartílago articular.

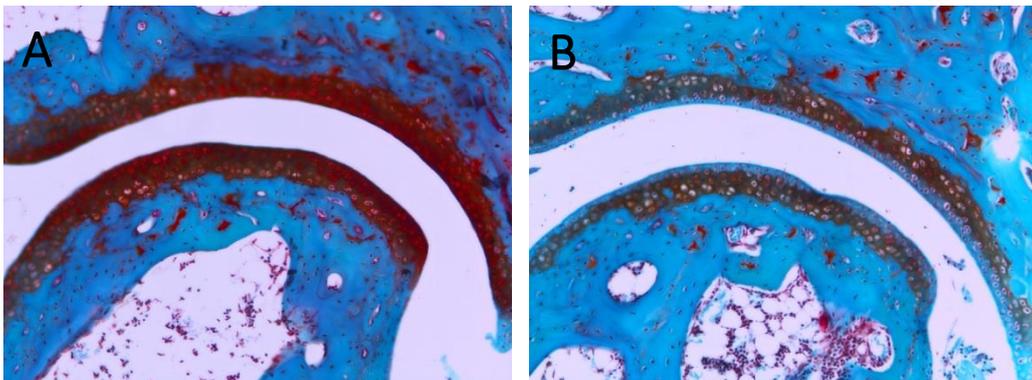


Figura 18. Tinción del proteoglicano del cartílago articular.
(Tinción safranina O-fast green)
Aumento x200

La **infiltración celular** se evaluó en una escala de 0-3, de acuerdo con el número de células inflamatorias en la cavidad sinovial (exudado) y en el tejido sinovial (infiltrado), donde 0= ninguna célula y 3= número más elevado de células en una muestra artrítica.

Otro parámetro característico en la AR es la progresiva pérdida de cartílago articular. En condiciones fisiológicas el cartílago murino

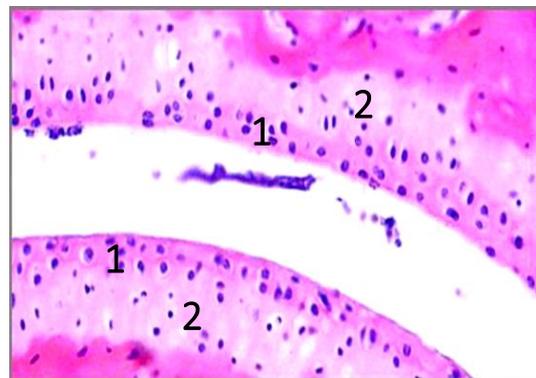
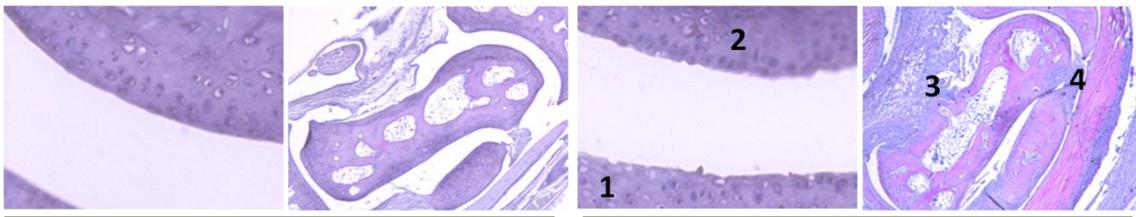


Figura 19. Cartílago articular de ratón. (Tinción hematoxilina-eosina)
Aumento x400

3. Material y métodos

está formado por una capa externa (figura 19, número 1) fácilmente destruible y una capa más interna y resistente (figura 19, número 2) que se conoce con el nombre de cartílago calcificado. La integridad del cartílago articular se evaluó por separado, teniendo en cuenta la disminución en el número de condrocitos (la **densidad de condrocitos** se encuentra disminuida en las articulaciones afectadas) y la aparición de condrocitos muertos, mediante la visualización de cavidades vacías (*empty lacunae*), así como la pérdida o **erosión en la superficie del cartílago articular** (Figura 20).



Articulación sana

Articulación artrítica

Figura 20. Fotografías de tobillos de ratón sano y artrítico teñidos con hematoxilina/eosina. Podemos observar la muerte de condrocitos (1), la erosión de la superficie del cartílago (2), y el infiltrado (3) y exudado (4) de células inflamatorias en la articulación artrítica.

El grado de condrocitos muertos se evaluó en una escala de 0-3, donde 0= no pérdida de la densidad de células ni aparición de cavidades vacías y 3= una pérdida completa de condrocitos en la capa del cartílago. La erosión en la superficie del cartílago se evaluó teniendo en cuenta la pérdida en la continuidad del mismo. Normalmente la erosión comienza en las zonas laterales. Para ello, se empleó una escala de 0-3, donde 0= no pérdida del cartílago y 3= una pérdida completa del cartílago articular (Joosten et al. 1997).

Por último, se evaluó la **regeneración ósea**. Además del proceso de erosión ósea, en los modelos artríticos, se produce frecuentemente formación de nuevo hueso, en estadios avanzados de la enfermedad.

Los osteofitos (figura 21) son zonas de crecimiento anómalo de hueso que aparecen cuando existe mucha infiltración y destrucción ósea ya que el hueso intenta regenerarse.

3. Material y métodos

En un primer estadio, el osteofito aparece como tejido cartilaginoso (figura 21A) y posteriormente, a los 14-21 días, se transforma en hueso (figura 21B). Los osteofitos suelen aparecer en las zonas laterales de la tibia.

Todas las puntuaciones se llevaron a cabo por observadores independientes sin conocimiento de los grupos experimentales.

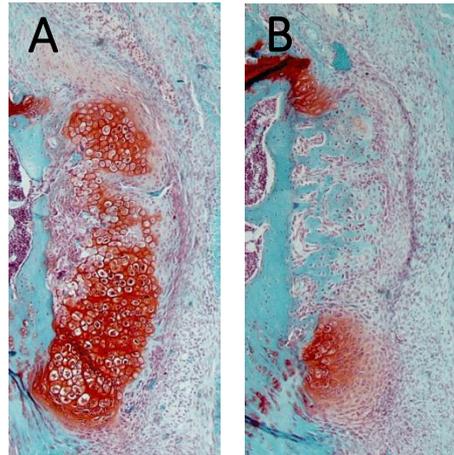


Figura 21. Imágenes de dos osteofitos en distintos estadios. (Tinción safranina O-fast green) Aumento x200

3.1.4.2 Análisis inmunohistoquímico

Esta técnica nos permitió visualizar proteínas presentes en los cortes parafinados de las articulaciones, utilizando un sistema de detección colorimétrico.

Protocolo experimental

Una vez sacrificados los animales, se extrajeron las articulaciones seleccionadas y se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7,4) durante al menos 4 días. A continuación, se realizó la descalcificación de las muestras con EDTA al 10% en agua ultrapura (pH 7,3) (ver Material y métodos apartado 3.1.4.1 a) durante 3 semanas, en agitación y a 4°C (renovando el descalcificante a la semana). Una vez descalcificadas las muestras, se realizó un lavado en agua ultrapura y se continuó con el procesamiento de las mismas hasta su completa deshidratación, inclusión en parafina y montaje en portas de las secciones tisulares siguiendo el mismo proceso que para el estudio histológico (ver Material y métodos, apartados 3.1.4.1 b y c). Tras desparafinar y lavar los cortes histológicos con PBS se incubaron con tampón citrato 20 minutos. La fijación en paraformaldehído puede generar enlaces cruzados que enmascaran los sitios antigénicos en las muestras de tejido, dando así una tinción débil o un falso negativo para la detección inmunohistoquímica de ciertas proteínas. Este tampón citrato está diseñado para romper los enlaces cruzados de proteínas, y por lo tanto, desenmascarar los antígenos y epítopos en secciones de tejidos fijados con paraformaldehído y embebidos en parafina, mejorando así la intensidad de la tinción de anticuerpos.

3. Material y métodos

- *Tampón citrato: 18 ml de ácido cítrico 0,1M (21g/l), 82 ml de citrato sódico 0,1M (29,4 g/l), H₂O c.s.p 1L*

Tras lavar con PBS-Tween 20 al 0.1%, las muestras se incubaron con H₂O₂ 2% en metanol (70-80%) durante 10 minutos a temperatura ambiente para bloquear la actividad peroxidasa endógena. Se realizaron varios lavados y se bloquearon las uniones inespecíficas con 10% de suero bovino fetal (SBF) durante 15 minutos. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario anti-HO-1 (Enzo life Science) a concentración 1/100 durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C según el experimento. Se empleó IgG de conejo o cabra (Dako) como control negativo. Las muestras se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo secundario biotinilado (Dako) (dil 1:250) y tras incubar con la avidina/peroxidasa de rábano (HRP) (Dako) (dilución 1/1000) durante 30 minutos se adicionó el sustrato diaminobenzidina (DAB) (Sigma). Finalmente se realizó una tinción de contraste con hematoxilina (1/10).

Para conservar la tinción durante un periodo prolongado, las muestras se deshidrataron y se montaron con medio de montaje no acuoso DPX (Panreac, Barcelona, España). Se observaron las muestras con un microscopio Nikon Eclipse E600FN (Nikon Instruments). Las células positivas se contaron en 2 cortes histológicos semiseriados de la articulación. En el caso del tobillo se seleccionó el cartílago de la zona tibia-calcáneo; en las patas delanteras se estudió el cartílago del radio. El contaje celular en las distintas muestras se realizó seleccionando la misma área para que los resultados obtenidos fueran comparables (tibia = 64,35 mm²; calcáneo = 55,08 mm²; radio = 34,55 mm²).

3.1.4.3 Técnicas experimentales para la cuantificación de analitos en suero, pata o exudado de bolsa de aire.

a) Determinación de proteínas por ELISA indirecto

La técnica de cuantificación de proteínas denominada ELISA es un tipo de ensayo inmunoenzimático, es decir, basado en el empleo de anticuerpos marcados con una enzima. Los niveles de determinadas proteínas se cuantificaron mediante esta técnica, siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante en cada caso. Dependiendo

3. Material y métodos

de cuantos anticuerpos se emplean, estos ensayos se dividen en directos o indirectos. El ELISA directo se basa en que el antígeno a cuantificar se une a un anticuerpo primario específico que lleva unida la enzima. Mientras que en el ELISA indirecto, el antígeno también es reconocido por el anticuerpo primario que, en este caso, no lleva la enzima. Una vez unidos antígeno-anticuerpo primario, el anticuerpo primario es reconocido por el anticuerpo secundario que es el portador de la enzima.

Las muestras a ensayar fueron los homogeneizados de papa, el suero o el exudado de la bolsa de aire dependiendo del estudio.

b) Protocolo para la determinación de citocinas y otros mediadores (sistema de detección colorimétrico)

Este método de determinación de analitos está basado en el sistema ELISA en fase sólida. Los ensayos colorimétricos dan un producto de reacción coloreado que absorbe luz en el espectro visible, siendo la densidad óptica del mismo proporcional a la cantidad de producto medido (dentro de un cierto rango). Para ello, se utiliza un anticuerpo primario o de captura que recubrirá los 96 pocillos de la placa, junto con un anticuerpo secundario o de detección biotinilado y el sistema conjugado estreptavidina-peroxidasa. Se trata de un sistema sencillo, específico, preciso y reproducible que permite cuantificar numerosas citocinas en sobrenadantes de cultivos celulares, suero y otros fluidos biológicos.

Mediante esta técnica se determinaron los niveles de distintas citocinas y quimiocinas. El protocolo de los diferentes tipos de ELISA es variable y siempre se lleva a cabo siguiendo de manera estricta las instrucciones del fabricante (tabla 3). Tras incubar la placa de 96 pocillos *high binding* una noche a 4°C con el anticuerpo de captura correspondiente, se lavó la placa con tampón de lavado (PBS al 0,05% de Tween-20), seguidamente se realizó el bloqueo de las uniones inespecíficas, se adicionaron las muestras en estudio y los correspondientes estándares. Tras el periodo de incubación adecuado en cada caso, se lavó varias veces y se adicionó el anticuerpo de detección biotinilado, incubándolo a temperatura ambiente durante el periodo establecido. Después de una serie de lavados con el tampón, se añadió la solución del conjugado estreptavidina-peroxidasa, con su respectivo periodo de incubación. Tras sucesivos

3. Material y métodos

lavados con el tampón, se añadió la solución de tetrametilbencidina (TMB) y se incubó durante aproximadamente 15 minutos en oscuridad. Este sustrato cromogénico es oxidado por la enzima, dando lugar a la aparición de coloración azul. La adición de una solución de parada (ácido sulfúrico 2N) hizo que el color de la solución cambiara a amarillo. La absorbancia fue cuantificada mediante un espectrofotómetro *VICTOR 2 Wallac 1420 multilabel counter* a 450 nm de longitud de onda. La cuantificación de las cantidades de proteína se llevó a cabo por comparación de las absorbancias de las muestras en estudio con las absorbancias de los puntos de una curva estándar de concentraciones conocidas.

Proteína	Muestra	Sensibilidad	Fabricante
CXCL-1	Homogeneizado pata, exudado MAP	8 pg/ml	Promokine (Heidelberg, Alemania)
MMP-3	Homogeneizado pata, exudado MAP, suero	20 pg/ml	R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, EE.UU.)
IL-6	Homogeneizado pata	4 pg/ml	eBioscience (San Diego, CA, EE.UU.)
IL-10	Homogeneizado pata	30 pg/ml	eBioscience (San Diego, CA, EE.UU.)
IL-17	Homogeneizado pata	5 pg/ml	R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN, EE.UU.)
VEGF-A	Homogeneizado pata	20 pg/ml	eBioscience (San Diego, CA, EE.UU.)
MCP-1	Homogeneizado pata	15 pg/ml	eBioscience (San Diego, CA, EE.UU.)

Tabla 3. Mediadores analizados por ELISA.

c) Protocolo para la determinación de las citocinas TNF α e IL-1 β (sistema de detección fluorométrico)

Los niveles de TNF α e IL-1 β en los sobrenadantes de los homogeneizados de patas, se determinaron mediante fluoroinmunoensayo de tiempo resuelto (Pennanen et al. 1995). Los ensayos de fluorescencia son una simple variación de los colorimétricos; la enzima convierte el sustrato en un producto de reacción que emite fluorescencia cuando es excitado a una determinada longitud de onda, siendo las unidades relativas de fluorescencia (fotones de luz emitidos) proporcionales a la cantidad de producto

3. Material y métodos

analizado. Los ensayos de fluorescencia son ligeramente más sensibles que los colorimétricos y amplían el rango de medida.

Para ello, se cubrió una placa *high binding* de 96 pocillos con el anticuerpo primario anti-TNF α o anti-IL-1 β (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, EE.UU.) y se dejó incubar una noche a 4°C. Seguidamente, se lavó la placa con tampón de lavado (PBS al 0,05% de Tween-20) y se bloqueó la placa con PBS al 3% (TNF α) o 0,5% (IL-1 β) de albúmina de suero bovino (BSA) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar la placa 3 veces con la solución de lavado se añadieron las muestras, los estándares y el anticuerpo secundario anti-TNF α o anti-IL-1 β biotinilado (R&D Systems Inc.), dejando incubar la placa 2 horas a temperatura ambiente.

Transcurrido ese tiempo, se procedió a lavar 3 veces con el tampón de lavado y se adicionó el complejo europeo-estreptavidina (Delfia[®], PerkinElmer, Turku, Finlandia) durante 30 minutos. Tras realizar varios lavados, se añadió una solución intensificadora de la fluorescencia (Delfia[®] Enhancement Solution, PerkinElmer). La fluorescencia emitida fue medida con un contador *VICTOR 2 Wallac 1420 multilabel counter* (sensibilidad de los kits: 5,1 y 3 pg/ml, respectivamente).

d) Determinación de eicosanoides por radioinmunoensayo (RIA)

La técnica del RIA (Moroney et al. 1988) se empleó en nuestros estudios para la detección de los niveles de los eicosanoides prostaglandina E₂ (PGE₂) y leucotrieno B₄ (LTB₄) en los sobrenadantes de los homogeneizados de pata, en el suero de los animales y en el exudado de bolsa de aire. Esta técnica radiométrica detecta la radiactividad (emisiones β) presente en la muestra biológica en estudio que contiene una cantidad de eicosanoide desconocida. El principio básico del RIA se basa en la competencia entre dos antígenos, el eicosanoide presente en las muestras en estudio y una cantidad fija de eicosanoide marcado con tritio (³H), por una cantidad fija y conocida de anticuerpo específico anti-eicosanoide con un número limitado de lugares de unión. Así pues, a mayor concentración de eicosanoide en nuestra muestra, menor cantidad de eicosanoide radiactivo se unirá al anticuerpo específico, produciéndose así una relación inversa entre los niveles de eicosanoide de la muestra en estudio y los niveles de

3. Material y métodos

radiactividad detectados. De este modo, la medida de emisión radiactiva β de los complejos antígeno-anticuerpo será mayor cuanto menos eicosanoide tengamos en nuestra muestra problema y menor cuanto más eicosanoide haya presente en dicha muestra. Los niveles de radiactividad en cuentas por minuto (cpm) son detectados en un contador de centelleo.

Las muestras experimentales y los patrones de una curva estándar de PGE₂ o LTB₄ se pipetearon en tubos de ensayo de vidrio y se diluyeron con los tampones específicos para RIA de PGE₂ (A1 y B1) y el tampón de RIA para LTB₄ (A1). A continuación, se añadió el anticuerpo anti-PGE₂ o anti-LTB₄ (Sigma) y la PGE₂ tritiada o LTB₄ tritiado, respectivamente, tal y como se detalla en la tabla 4.

Tubos	Tampón A1	Tampón B1	Patrones/ Muestras	Eicosanoide radiactivo	Anticuerpo	C. Activo-dextrano
TA	400 μ l	100 μ l	-	100 μ l	-	-
NSB	200 μ l	100 μ l	-	100 μ l	-	200 μ l
B ₀	100 μ l	100 μ l	-	100 μ l	100 μ l	200 μ l
Patrones	-	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	200 μ l
Muestras	-	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	200 μ l

Tabla 4. Protocolo del RIA. TA (Actividad total), NSB (Unión inespecífica), B₀ (Unión máxima del eicosanoide-³H por el anticuerpo)

- *Tampón A1 PGE₂: (pH 7,4)*
 - NaH₂PO₄ x 2H₂O 1,19 g/l*
 - Na₂HPO₄ 4,6 g/l*
 - BSA 5,1 g/l*
 - Azida sódica 0,1%*
 - H₂O destilada c.s.p. 1L.*
- *Tampón A1 LTB₄: (pH 7,4)*
 - NaH₂PO₄ x 2H₂O1,19 g/l*
 - Na₂HPO₄ 4,6 g/l*
 - NaCl..... 9 g/l*
 - γ -globulina 1 g/l*
 - Azida sódica0,1 %*
- *Tampón B1: (pH 7,4): Tampón A1 + NaCl 9 g/l*

* El RIA de LTB₄ no lleva tampón B1, éste se sustituye por el mismo volumen de tampón A1 LTB₄.

3. Material y métodos

- *Carbón activo-Dextrano: 0,5 g de Dextrano en 100 ml de Tampón A1 + 1 g de Carbón activado.*
- *³H-PGE₂: [5,6,8,9,11,12,14,15, (n)-³H] PGE₂ (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España).*
- *³H-LTB₄: [5,6,8,9,11,12,14,15 ³H(N)] LTB₄ (PerkinElmer, Boston, MA, EE.UU.)*

A continuación, se agitaron los tubos y se incubaron a 4°C durante unas 18/24 horas. Transcurrido ese tiempo se incorporó la mezcla de carbón activo y dextrano y se agitaron los tubos. Gracias al dextrano cubierto de carbón activo, el eicosanoide no unido al anticuerpo se separa por centrifugación. Los tubos se dejaron reposar durante 10 minutos a 4°C y posteriormente se centrifugaron a 2.500 r.p.m (15 minutos a 4°C) para precipitar el material radiactivo no unido al anticuerpo. A continuación, los sobrenadantes resultantes se decantaron (400 µl) y se mezclaron con 3 ml de líquido de centelleo *Optiphase "Supermix"* (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE.UU.) que amplifica la señal radiactiva. Finalmente, la emisión β presente en dichos sobrenadantes, procedente del complejo "eicosanoide radiactivo-anticuerpo", fue medida en un contador de centelleo líquido *Microbeta Trilux* (Wallac, Turku, Finlandia). Los valores obtenidos se interpolaron en la curva estándar de PGE₂ o LTB₄.

e) Inmunoensayo de mediadores por Multiplex de Luminex®

La técnica de Multiplex se utilizó para medir los niveles de distintos mediadores presentes en las muestras séricas de los ratones. Los inmunoensayos Multiplex de Luminex® (Millipore, Corporation, Billerica, MA, EE.UU.) se basan en la tecnología xMAP® la cual utiliza microesferas de poliestireno ("beads") que contienen distintas proporciones de dos fluorocromos que al ser excitados por el láser del citómetro de flujo emiten señales diferentes, siendo así posible separar las distintas poblaciones de microesferas por la composición de fluorocromos. Usando unas proporciones precisas de ambos fluorocromos, podemos obtener hasta 100 grupos de microesferas distintas. Cada grupo de microesferas se conjuga con un anticuerpo específico que se unirá al analito en estudio. A continuación, se utiliza un anticuerpo secundario biotinilado frente al analito en estudio, al que posteriormente se le añade estreptavidina conjugada con

3. Material y métodos

ficoeritrina, que al ser excitada emitirá fluorescencia. El analizador automático desarrollado por Luminex® es capaz de identificar a cada grupo de microesferas y detectar la fluorescencia asociada a cada grupo durante el ensayo. Se utiliza un citómetro de 2 láseres: uno de ellos excita los fluorocromos de los “beads” (discriminando así las distintas poblaciones de microesferas) y un segundo láser excita la ficoeritrina, la cual emitirá fluorescencia; siendo ésta proporcional a la cantidad de analito unido a la microesfera.

La combinación de los distintos grupos de microesferas en un único pocillo nos permite analizar cuantitativamente hasta 100 parámetros simultáneamente en una misma muestra de una forma sensible y específica. Permite obtener límites de sensibilidad imposibles de obtener en sistemas tradicionales como el ELISA o RIA.

Esta técnica se utilizó en la presente Tesis para medir los niveles de distintas citocinas presentes en el suero de los ratones (tabla 5). Los sueros, antes de su utilización, se centrifugaron a 3.300 r.p.m durante 10 minutos. Tras reconstituir todos los reactivos según las indicaciones del fabricante, se hidrató la placa con tampón durante 10 minutos, se eliminaron los restos del mismo y se procedió a añadir la curva estándar, los controles de calidad internos y las muestras de suero.

A continuación, se añadió a cada pocillo la mezcla de microesferas marcadas con el anticuerpo específico para el biomarcador en estudio. La placa se incubó durante toda una noche a 4°C y en agitación. Transcurrido ese tiempo, los pocillos se lavaron 3 veces con el tampón de lavado y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con una mezcla comercial que contenía los correspondientes anticuerpos de detección. A continuación, se añadió a cada pocillo un volumen fijo de estreptavidina-ficoeritrina y se incubó la placa en oscuridad y en agitación (30 minutos a temperatura ambiente). Tras realizar un lavado, se añadieron 100 µl de líquido del sistema y, en oscuridad, se agitó durante 10 minutos para resuspender las microesferas y asegurar una distribución homogénea de éstas en el pocillo. La placa se introdujo en el citómetro de flujo (que contó 50 de las microesferas que pasaron por el lector).

3. Material y métodos

Proteína	Sensibilidad	Fabricante
IL-1 β	2.0 pg/ml	Millipore, Billerica, MA, USA
IL-6	1.8 pg/ml	Millipore, Billerica, MA, USA
IL-17	0.5 pg/ml	Millipore, Billerica, MA, USA
IFN- γ	0.9 pg/ml	Millipore, Billerica, MA, USA
MCP-1	5.3 pg/ml	Millipore, Billerica, MA, USA
TNF α	1.0 pg/ml	Millipore, Billerica, MA, USA
VEGF	0.3 pg/ml	Millipore, Billerica, MA, USA
E-selectina	5.0 pg/ml	Millipore, Billerica, MA, USA
ICAM-1	3.0 pg/ml	Millipore, Billerica, MA, USA
PAI-1	2.0 pg/ml	Millipore, Billerica, MA, USA
Osteocalcina	7.0 pg/ml	LINCOplex™ system (Millipore Iberica, Madrid, Spain)
RANK-L	3.0 pg/ml	LINCOplex™ system (Millipore Iberica, Madrid, Spain)

Tabla 5. Citocinas analizadas mediante Multiplex

f) Determinación de la actividad mieloperoxidasa

Parte de los efectos inflamatorios provocados por la presencia de leucocitos PMNs en los tejidos se atribuye a la liberación del contenido de sus gránulos. Estos leucocitos poseen dos tipos de gránulos: los primarios o azurófilos que contienen mieloperoxidasa (MPO), elastasa y otras enzimas hidrolíticas, y los secundarios o específicos, que contienen lisozima y colagenasa (Schettler et al. 1991). Así pues, los niveles de la enzima MPO son indicadores del proceso de desgranulación leucocitario. La MPO es una

3. Material y métodos

enzima lisosomal presente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos. Esta enzima utiliza el peróxido de hidrógeno, generado tras la activación del neutrófilo, para oxidar los iones Cl^- presentes en el medio y dar lugar al ácido hipocloroso, un potente agente oxidante al que se atribuye la capacidad bactericida del neutrófilo.



Entre las ROS producidas por el neutrófilo se considera al ácido hipocloroso como el oxidante más reactivo; ya que es capaz de dañar las estructuras proteicas y de reaccionar con los ácidos grasos insaturados originando la desestabilización de las membranas celulares.

El protocolo, adaptado para el trabajo en microplaca, se basa en el método descrito por De Young y colaboradores (De Young et al. 1989). Los homogeneizados de pata se incubaron con PBS (pH 7,4) y tampón fosfato (pH 5,4). A continuación, se adicionó el peróxido de hidrógeno (0,052%). Tras incubar a 37°C durante aproximadamente 5 minutos, se añadió el sustrato de la reacción: TMB disuelta en DMF. La placa se incubó durante 3 minutos y se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2N (tabla 6). La absorbancia fue cuantificada mediante un espectrofotómetro *VICTOR 2 Wallac 1420 multilabel counter* a 450 nm de longitud de onda.

- *Peróxido de hidrógeno 30% (p/v) (Sigma): Preparar la dilución de trabajo en agua destilada en el momento y mantener en hielo: 86,6 μl de H_2O_2 30% hasta 50 ml de agua destilada (Cf 0,052%)*

- *3,3', 5,5'-TMB (Sigma): Preparar TMB (18 mM) en DMF (dimetilformamida) (preparada al 8% en agua destilada): 0,8 ml de DMF + 9,2 ml de agua destilada /56,39 mg de TMB para 10 ml*

- *Tampón fosfato sódico (pH 5,4): Na_2HPO_4 al 0,0866 % y NaH_2PO_4 al 1,153 %*

3. Material y métodos

	Blanco	Muestra
Homogeneizado	-	5 µl
Tampón PBS	195 µl	195 µl
Tampón fosfato	20 µl	20µl
H ₂ O ₂	20 µl	20µl
Incubar 5 minutos a 37°C		
TMB	20 µl	20µl
Incubar 3 minutos a 37°C		
H ₂ SO ₄ 2N	50 µl	50µl

Tabla 6. Protocolo experimental para la determinación de MPO.

g) Determinación de proteínas por Western Blot

La técnica del Western Blot o “immunoblotting” permite visualizar proteínas que han sido transferidas a una membrana sintética, utilizando un sistema de detección quimioluminiscente. Esta técnica permite separar las proteínas en función de su peso molecular. Las proteínas desnaturalizadas se separan electroforéticamente sobre un gel de poliacrilamida después de establecer una diferencia de potencial. Se puede identificar una sola proteína en función de su peso molecular a partir de una mezcla proteica utilizando para ello un anticuerpo primario que reconoce específicamente epítopos del antígeno en estudio adherido a un soporte sólido. Tras incubar con el anticuerpo secundario marcado con una enzima y añadir el sustrato, se puede correlacionar la intensidad de la señal obtenida al revelar con la mayor o menor expresión de la proteína en estudio

Protocolo experimental

Los sobrenadantes de los homogeneizados de pata o el exudado de la bolsa de aire de ratón, dependiendo del experimento, fueron sonicados a 4°C durante 2 ciclos de 10 segundos. A continuación, se centrifugaron las muestras a 10.500 r.p.m durante 15 minutos a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos, contenían el extracto total de proteína. Como la enzima HO-1 es de localización microsomal, para determinar su expresión es necesario separar esta fracción. Para ello, el extracto total de proteína se sometió a

3. Material y métodos

ultracentrifugación a 40.000 r.p.m. (1 hora y 40 minutos a 4°C) quedando la fracción citosólica en el sobrenadante y la microsomal en el pellet. Esta fracción microsomal fue recogida para realizar la cuantificación de proteínas. La concentración proteica de cada muestra se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), con el reactivo *DC Bio-Rad protein* (Laboratorios Bio-Rad, Richmond, CA, EE.UU.) y utilizando BSA como patrón. Las muestras se mezclaron a partes iguales con tampón de carga desnaturante de Laemmli (1:1), conteniendo cada muestra la misma cantidad de proteína.

- *Tampón de Laemmli: Tris-HCl 1M (pH 6,8) al 16% (v/v), sodio dodecilsulfato (SDS) al 4% (p/v), glicerol al 20% (v/v), DTT al 3,08% (p/v) y azul bromofenol al 4% (v/v).*

Las muestras se calentaron a 90°C durante 5 minutos para facilitar la desnaturalización de las proteínas hasta su estructura secundaria, perdiendo así su forma tridimensional. Las proteínas contenidas en cada muestra (30 µg) se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamidabisacrilamida-SDS, utilizando un equipo de electroforesis (Laboratorios Bio-Rad, Madrid, España) y un tampón de electroforesis:

- *Tampón de electroforesis: glicina 14,4 g/l, trizma base 3 g/l y SDS al 0,1% (pH 7,4).*

Este tipo de electroforesis se conoce como desnaturante ya que el tampón de Laemmli contiene el agente reductor DTT (agente que rompe los puentes disulfuro) y el detergente aniónico SDS, que desnaturalizan las proteínas. Además, el SDS recubre la proteína de forma proporcional a su peso molecular y bloquea la carga propia de la molécula, confiriendo al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa. Sin SDS, las distintas proteínas que tienen masas moleculares similares migran de forma diferente debido a diferencias en la proporción carga/masa, ya que cada proteína tiene un punto isoeléctrico distinto. De este modo, las proteínas migran hacia el ánodo debido a su carga negativa, separándose únicamente en función de su tamaño. Así pues, las proteínas más ligeras atravesarán el gel a más velocidad que las de mayor peso molecular, consiguiéndose la separación por peso molecular. Las propiedades del gel de poliacrilamida vienen determinadas por el tamaño del poro por el cual han de pasar las

3. Material y métodos

proteínas. El tamaño del poro está determinado por la proporción de acrilamida y bisacrilamida (índice T o grado de entrecruzamiento). El porcentaje utilizado en la presente tesis fue del 10% ya que permitió la adecuada separación de las proteínas en estudio.

Finalizada la electroforesis, se transfirió el gel durante 120 minutos a 125 mA constantes a una membrana de polivinilideno difluoruro (PVDF) (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España) tratada previamente con metanol. Esta membrana tiene una gran capacidad de unión a proteínas y gran resistencia mecánica. El sistema de transferencia utilizado fue el semiseco, en el que los geles son sometidos a una intensidad de corriente entre dos electrodos planos entre los cuales se colocó el gel y la membrana cubiertos a ambos lados por papel de filtro empapado en tampón de transferencia. De este modo, las proteínas migran del gel y quedan adheridas a la superficie de la membrana. Este sistema de transferencia semiseco tiene ventajas respecto a otros procedimientos como son la economía de reactivos y la facilidad de montaje. Una vez en la membrana, las proteínas están accesibles para interactuar con otras moléculas que permitan su identificación.

- *Tampón de transferencia: glicina 2,88 g/l, trizma base 0,6 g/l y SDS al 0,01% (pH 7,4).*

A continuación, las membranas se bloquearon con leche desnatada al 4% (p/v) en tampón PBS-Tween 20 (0,1%) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las proteínas de la leche bloquean los lugares inespecíficos a los que podría unirse el anticuerpo utilizado, previniendo así la unión no específica de los anticuerpos a la membrana, evitando falsos positivos e inespecificidad. Seguidamente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario específico para HO-1 (32kD) diluido 1/1000 en tampón PBS-Tween al 2% de BSA durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras un exhaustivo lavado, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario o IgG de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (1/5000) (Dako) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las bandas inmunorreactivas se visualizaron mediante el sistema ECL (sistema de quimioluminiscencia intensificado) (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España). La reacción quimioluminiscente se produjo tras el

3. Material y métodos

tratamiento de la membrana durante 1 minuto con una solución que contenía luminol y peróxido de hidrógeno a partes iguales. Así, la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario catalizó la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno.

En este proceso, el luminol pasa a su estado basal reducido emitiendo luz en el rango ultravioleta, y dicha luz puede ser detectada por un sistema computerizado de revelado *Autochemi™ System* (UPV Inc., Upland, CA, EE.UU.). Este aparato está acoplado a una cámara fotográfica capaz de capturar imágenes secuencialmente y está dotado del programa *LabWorks™ 4.6* para la adquisición y análisis de imágenes.

Posteriormente, las membranas se reincubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo β -Actina de 40kD (Sigma) (1/5000) para visualizar las proteínas totales y así poder comprobar que la carga proteica de cada muestra era comparable. La expresión de cada proteína se normalizó con la de la proteína control revelada en la misma membrana, mediante densitometría.

h) Análisis de la expresión génica por transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

La transcripción inversa (RT) y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) son dos técnicas que nos permiten estudiar el ARN mensajero (ARNm) y por lo tanto la expresión génica correspondiente a los tejidos en estudio. La transcripción inversa consiste en la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARNm extraído del tejido por medio de una enzima denominada transcriptasa reversa que utiliza ARN como molde para sintetizar ADN. En la RT son necesarios: un cebador aleatorio o fragmento corto de ADN que se une al ARN extraído en un punto determinado y a partir del cual se iniciará la elongación del ADNc, desoxirribonucleótidos o dNTP (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) que constituyen la materia prima a partir de la cual la enzima sintetizará la cadena complementaria, un inhibidor de ARNasas que prevenga la degradación del ARN y un tampón específico para la RT que incluya la cantidad adecuada de $MgCl_2$ necesaria para el rendimiento óptimo de la enzima. El ADNc se amplifica por PCR, una reacción cíclica que nos permite obtener cantidades apropiadas de ADNc. La acumulación de producto en una reacción de PCR tiene la forma matemática de una progresión geométrica de fórmula $ADN_f = ADN_i 2^c$ (crecimiento exponencial). De modo que es

3. Material y métodos

posible calcular la cantidad inicial de una muestra a partir de la cantidad de producto acumulado después de un cierto número de ciclos. Ese crecimiento exponencial es limitado. En un momento dado el crecimiento deja de ser exponencial para ser lineal y, más adelante, nulo. En la reacción de la PCR se requiere: una ADN-polimerasa termoestable capaz de elongar el molde produciendo su amplificación, los dos cebadores (sentido y antisentido) con secuencias específicas complementarias al segmento inicial y final de ADN que queremos amplificar, desoxirribonucleótidos, el tampón para PCR con los iones necesarios para que funcione la polimerasa y la muestra problema de ADNc obtenida de la RT.

La reacción en cadena de la polimerasa comenzará al someter la mezcla descrita a una serie de cambios drásticos de temperatura de forma cíclica. Para ello utilizaremos un aparato termociclador.

Cada uno de estos ciclos se compone de tres fases. En primer lugar se eleva la temperatura de la reacción para separar las hebras de ADN (fase de desnaturalización) y a continuación la temperatura baja, lo que permite que los cebadores se unan a las regiones adecuadas de la hebra de ADN, ensamblándose y actuando como límites de la región de la molécula que va a ser duplicada (fase de unión). Posteriormente, se eleva de nuevo la temperatura y la polimerasa comienza a copiar formándose una hebra nueva complementaria (fase de extensión). Después de varios ciclos el número de copias crece exponencialmente obteniéndose los productos de la PCR. Para asegurarnos que analizamos las reacciones en la fase de crecimiento exponencial, se monitoriza la acumulación de producto amplificado ciclo tras ciclo.

La RT-PCR a tiempo real ofrece la posibilidad de cuantificar el número de copias realizadas a partir del ADNc original, obteniéndose como resultado la expresión relativa del gen en estudio. Se basa en la detección de un fluorocromo, que se intercala en las dobles hebras de ADN a medida que se va sintetizando y cuya señal aumenta en proporción directa con la cantidad de producto de PCR en la reacción ($\Delta dsADN = \Delta$ fluorescencia). Para ello, se emplea un ciclador térmico que tiene acoplado un sistema de detección capaz de captar y cuantificar la señal emitida al final de cada ciclo. Se pueden utilizar diferentes reactivos fluorescentes como agentes intercalantes (en el

3. Material y métodos

presente trabajo *SYBR Green*) que se unen a la doble cadena de ADN dando un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de producto de PCR.

Protocolo para el aislamiento y extracción de ARN

Al finalizar cada experimento, se extrajeron muestras de tejido de hígado de ratón. Las biopsias obtenidas se congelaron en N₂ líquido en crioviales o en eppendorfs libres de ARNasas hasta el proceso de extracción. El ARN total fue extraído utilizando 1 ml del reactivo TRIzol® por cada 4 biopsias utilizando un Mini kit RNeasy (Qiagen, Venlo, Holanda) (Lysing Matriz D). El tejido se homogeneizó en un Instrumento MagNALyser (Roche Applied Science, Almere, Holanda). Una vez disgregado el tejido, los extractos se transfirieron a tubos de polipropileno y se añadieron 200 µl de cloroformo por muestra para conseguir la separación del ARN y la precipitación de proteínas. Tras agitar manualmente durante unos 3 minutos a temperatura ambiente, los tubos se mantuvieron en hielo 15 min, posteriormente se centrifugaron a 11.000 r.p.m (15 minutos a 4°C), consiguiéndose así la separación de las 3 fases, una fase inferior rojiza (cloroformo y proteínas), una interfase (ADN) y una fase superior acuosa e incolora que contenía el ARN. El sobrenadante acuoso (500 µl) se separó cuidadosamente, se transfirió a tubos nuevos y se precipitó el ARN presente con alcohol isopropílico (500 µl). Los tubos se centrifugaron a 11.000 r.p.m (10 minutos a 4°C), apareciendo un precipitado de ARN. Tras aspirar cuidadosamente el sobrenadante, lavamos el pellet con 1 ml de etanol al 70% para quitar los restos de isopropanol. Tras agitar con el vortex y soltar el pellet, centrifugamos a 11.000 r.p.m (5 minutos a 4°C). Tras realizar otro lavado con etanol 70%, centrifugamos, recogimos el sobrenadante y dejamos secar el pellet. El precipitado de ARN se resuspendió en 20 µl de agua libre de ARNasas a 300 r.p.m (10 minutos a 55 °C). La cuantificación del ARN se llevó a cabo utilizando el sistema Nanodrop, (Thermo Scientific) y midiendo a una densidad óptica de 260/280 nm.

Protocolo de la RT

Para la obtención de ADNc, las muestras (2 µg de ARN total en 8 µl de volumen por muestra) se purificaron para descartar la presencia de ADN genómico contaminante en

3. Material y métodos

las muestras mediante la utilización de una enzima ADNasa. Las muestras se incubaron con 2 µl de Mix (ADNasa y tampón) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo utilizando 1 µl de EDTA (10 minutos a 65°C). A continuación, la transcripción reversa se realizó añadiendo 9 µl de una mezcla de los siguientes componentes: enzima transcriptasa reversa (*Moloney murine leukemia virus*), inhibidor de ARNasas, oligo(dT) cebador, dNTPs (Invitrogen) y tampón, obteniendo un volumen final de reacción de 20 µl.

Los tubos se introdujeron en el termociclador y se procedió a la transcripción reversa. El ciclo termal constó de las siguientes fases:

- Incubación a 25°C durante 5 minutos; el cebador aleatorio se une a la cadena de ARN.
- Incubación a 39°C durante 60 minutos; se activa la transcriptasa reversa y sintetiza el ADNc.
- Elevación de la temperatura a 95°C durante 5 minutos; se inactiva la enzima.

El ADNc obtenido se diluyó con 20 µl de agua y se almacenó a -20°C hasta su posterior análisis.

Protocolo de la RT-PCR y análisis de datos

En una placa de 96 pocillos específica para PCR se añadió por pocillo un volumen total de 20 µl que contenía 10 µl de *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) que contenía: la enzima ADN polimerasa, los dNTPs y el fluorocromo intercalante *SYBR Green*; al que se le añadieron 6 µl de *Mix* (1,2 µl de los correspondientes cebadores sentido (5 µM), 1,2 µl de los correspondientes cebadores antisentido (5 µM) y 3,6 µl de agua milliQ) y 4 µl de la muestra de ADNc (dilución 1/10 de la muestra inicial) o agua destilada para el blanco.

Los ensayos de la PCR cuantitativa a tiempo real se realizaron en un aparato termociclador *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). El ADNc fue amplificado según las siguientes condiciones de la PCR:

3. Material y métodos

Fase	Temperatura	Tiempo
Incubación	50° C	2 minutos
Activación de la polimerasa	95° C	10 minutos
PCR (40 ciclos): Desnaturalización	95° C	15 segundos
Unión/extensión	60° C	60 segundos

Tabla 7. Condiciones para la PCR

2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C para la activación de la polimerasa, seguidos de 40 ciclos compuestos de 2 pasos: desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y unión/extensión a 60°C durante 1 minuto, con una adquisición de datos durante los últimos 30 segundos. Las secuencias de los cebadores utilizados en los ensayos de RT-PCR del gen de referencia EF2 y de los genes de interés se encuentran especificadas en la tabla 8.

Para el análisis cuantitativo del producto se analizó la curva de amplificación, que consta de tres zonas o fases: fase de latencia, con un fondo inespecífico más o menos estable; fase exponencial, donde la fluorescencia empieza a crecer por encima del fondo; fase de saturación, en la que tras varios ciclos, la fluorescencia deja de crecer y se estabiliza.

El número de copias del correspondiente producto de la PCR o “amplicón” se cuantificó conociendo su ciclo umbral (Ct) y utilizando el método delta-delta Ct (Livak y Schmittgen 2001). El Ct de una muestra es el ciclo en el que su intensidad de fluorescencia sobrepasa un umbral preestablecido. De manera que cuanto antes alcance este umbral menor será su valor de Ct, mayor su intensidad de fluorescencia y mayor la expresión relativa de la muestra analizada. ΔCt representa la diferencia entre el Ct del gen estudiado y el Ct de un gen control (EF2) para la misma muestra. La expresión relativa de los genes en estudio se representó mediante valores de $2^{-\Delta Ct}$.

Para concluir, la especificidad de la PCR se comprobó mediante el análisis de la curva de fusión de los productos, la cual posibilita la caracterización del fragmento amplificado por su temperatura de fusión (Tm). La curva de fusión del producto consiste en la monitorización de la fluorescencia de las muestras mientras se aumenta

3. Material y métodos

progresivamente la temperatura (de 55 a 95°C). Cuando se alcanza la T_m de algún fragmento presente en la muestra, se observa un repentino descenso de la fluorescencia de ésta. La derivada de la gráfica resultante, muestra tantos picos como fragmentos haya en la muestra, lo que permite detectar si ha habido amplificaciones secundarias no específicas o dímeros de cebadores. Para cada gen utilizado, se confirmó la especificidad de la reacción, mediante el análisis de la curva de fusión.

gen	Cebadores sentido (5' – 3')	Cebadores antisentido (5' – 3')
EF2	5'-GCGGTCAGCACAAATGGCATA	5'-GACATCACCAAGGGTGTGCAG
Catalasa	5'-TGACATGGTCTGGGACTTCTGG	5'-TTGATGCCCTGGTCGGTCTT
GSTA-1	5'-CCCCTTTCCCTCTGCTGAAG	5'-TGCAGCTTCACTGAATCTTGAAAGC
GR	5'-GGCACTTGCGTGAATGTTGG	5'-GGCATCCCTTTTCTGCTTGATG
Ferritina	5'-CTTCGAGCCTGAGCCCTTTG	5'-CAGGTTGATCTGGCGGTTGA
Thrx-2	5'-GCTAGAGAAGATGGTCGCCAAGCAG	5'-TCCTCGTCCTTGATCCCCACAACTTG
SOD-2	5'-AATCTCAACGCCACCGAGGA	5'-TCTCCTTGGGTTCTCCACCA

Tabla 8. Lista de cebadores para el análisis de la expresión de genes por PCR cuantitativa a tiempo real.

3.2 MÉTODOS DE ESTUDIO EX VIVO

3.2.1 Aislamiento de células peritoneales

a) Obtención

En algunos experimentos, tras sacrificar los ratones por dislocación cervical, se extrajeron las células de la cavidad peritoneal. Para ello, se inyectaron 2 ml de suero fisiológico en la cavidad peritoneal, y se masajeó la región abdominal durante 2 minutos. A continuación, se realizó una pequeña incisión suficiente para introducir una

3. Material y métodos

pipeta Pasteur de 2 ml y obtener el fluido peritoneal. Una vez recogida la mayor cantidad de fluido peritoneal, administramos de nuevo 2 ml de suero fisiológico, y realizando varios lavados de las paredes abdominales, los recuperamos. La suspensión recogida se centrifugó a 400g durante 5 minutos a 4°C, obteniéndose la población de células.

En algunos casos, para aumentar la población de células en la cavidad peritoneal, se administró una solución de tioglicolato al 3% estéril por vía intraperitoneal. Esta solución actúa como un estímulo atrayendo células del sistema inmune. Dependiendo del tiempo al que se sacrifique al animal tras su administración, la población celular mayoritaria puede variar. De este modo, a las 3-4 horas de inyectar tioglicolato 3%, la mayor parte de células que extraeremos de la cavidad peritoneal serán neutrófilos, mientras que si lo hacemos a las 72-96 horas, las células más numerosas serán los macrófagos.

Una vez extraídas, las células se resuspendieron en medio *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) 10% completo, y se distribuyeron a una concentración de $0,25 \times 10^6$ células/pocillo en placa de 96 pocillos. Después de 2 horas, se realizó un lavado para eliminar las células no adherentes.

En los casos indicados, las células se estimularon con hemina 50 μ M (Sigma) un inductor de la expresión de HO-1, o con 25 ng/ml de forbol 12-miristato 13-acetato, (PMA, Sigma), inductor de la proliferación celular, en combinación con 0,5 μ g/ml de ionomicina (Sigma), ionóforo de calcio que colabora con el PMA en la estimulación celular. Las células se incubaron en estas condiciones durante 18 horas a 37°C en atmósfera constante de CO₂ al 5%.

Pasado este tiempo, las células se utilizaron bien para realizar una tinción de inmunofluorescencia para detectar HO-1 (ver Material y métodos, apartado 3.2.1 b) o para analizar por citometría de flujo la caracterización de macrófagos y neutrófilos que expresan esta enzima (ver Material y métodos y métodos, apartado 3.2.1 c).

3. Material y métodos

b) Tinción de células por inmunofluorescencia

Los macrófagos y neutrófilos peritoneales estimulados se tiñeron para observar la expresión de HO-1. Para ello, se retiró el medio de cultivo a las células y se lavaron con PBS. Tras fijar las células con paraformaldehído 2% durante 5 minutos, y permeabilizar la célula con un detergente como Tritón X-100 al 0,1% durante 10 minutos, se bloqueó la unión inespecífica con 10% de SBF durante 15 minutos. Se incubó el anticuerpo primario antiHO-1 (Enzo life Science - Stressgen, Victoria, Canadá) a una dilución 1:100 en PBS con SBF 1% y tritón X-100 0,1% utilizando 50 µl por muestra durante al menos 2 horas o en algunos casos toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo, realizamos un lavado con PBS e incubamos con 50 µl de anticuerpo secundario fluorescente (anti-rabbit IgG, R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) disuelto en PBS, durante 30 minutos a 4°C y protegiéndolo de la luz. Finalmente, lavamos para eliminar los posibles restos de partículas y artefactos y dejamos las células en suero fisiológico para observarlas en el microscopio de fluorescencia (Leica)

c) Caracterización de proteínas intracelulares y marcadores de membrana celular por citometría de flujo

Esta técnica se utilizó tanto en células peritoneales como en células provenientes de médula ósea (ver Material y métodos, apartado 3.2.2) y se marcaron diferentes proteínas intracelulares o marcadores de membrana dependiendo del experimento. Esto nos permite no solo ver la expresión de la enzima o citocina que nos interesa, sino también marcar las células para estudiar cuáles expresan la proteína de interés y cuáles no.

Protocolo experimental

En la mayoría de los casos el marcaje se llevó a cabo en placa de 96 pocillos de fondo redondo, ya que resulta más económico porque se necesita menor cantidad de reactivo que si se realiza en los tubos de poliestireno de 5 ml (BD Falcon). Aquellas células que no estaban sembradas en placa de 96 pocillos de fondo redondo, fueron despegadas del pocillo por incubación con tripsina 0,25% a 37°C durante 4 minutos. Una vez recogidas y lavadas las células con tampón de citometría (300g durante 5 minutos a

3. Material y métodos

4°C), se añadieron a la placa de 96 pocillos de fondo redondo. Con las células en la placa, se realizó un segundo lavado. Antes del marcaje específico, las células se incubaron (10 minutos a 4°C) con 25 µl del anticuerpo anti-Mouse CD16/CD32 (eBioscience, San Diego, CA, EE.UU.) disuelto a una proporción 1:100 en tampón de citometría. Este anticuerpo bloquea la unión inespecífica de inmunoglobulinas a los receptores FcγR ya que reacciona con el epítipo de ratón CD16 (Fc gamma receptor III) y CD32 (Fc gamma receptor II) que son los receptores de baja afinidad para la porción Fc de IgG de ratón y se expresan en las células B, monocitos/macrófagos, células NK y neutrófilos. Tras esta incubación, se añadieron directamente 50 µl/pocillo de una mezcla de anticuerpos conjugados a diferente fluoróforos (ver tabla 9) a las concentraciones apropiadas en tampón de citometría, para marcaje de proteínas de superficie.

Anticuerpo	Fluoróforo conjugado	Fabricante	Concentración Stock	Concentración de Uso
HO-1 mAb	FITC	ENZO Life Science	1 mg/ml	50 µg/ml
Anti-F4/80	APC	Ebioscience	0,2 mg/ml	2 µg/ml
Anti-Ly-6G (Gr-1)	PE	Ebioscience	0,2 mg/ml	40 ng/ml

Tabla 9. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

El marcador de macrófagos fue Anti-Mouse F4/80 y el de neutrófilos fue Anti Ly-6G (Gr-1). Las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C (en algunas ocasiones el marcaje se prolongó durante 12 horas). A partir de este punto, durante todas las incubaciones las células se protegieron de la exposición a la luz. A continuación, las células se lavaron dos veces y se permeabilizaron con 100 µl de Tritón X-100 0,1%, durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente las células se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 5 minutos a 4°C. Para eliminar el exceso de esta solución, las células se lavaron con 200 µl de tampón de citometría y se realizó la incubación (30 minutos a 4°C) con 50 µl de las concentraciones apropiadas de anticuerpos conjugados a diferentes fluoróforos, disueltos en tampón de citometría. Tras varios lavados, las células se resuspendieron en

3. Material y métodos

500 µl de tampón de citometría y se filtraron en filtros de 40 µm antes de ser adquiridas por el citómetro.

La adquisición y análisis de las muestras se realizó en el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson), utilizando del programa Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

3.2.2 Aislamiento de células de médula ósea de ratón

a) Obtención

La médula ósea es el tejido esponjoso blando que se encuentra en el interior hueco de los huesos largos. Este tejido contiene células inmaduras llamadas células madre hematopoyéticas que darán lugar a células sanguíneas.

Los huesos más utilizados para la extracción de médula ósea de ratón son el fémur y la tibia, ya que al ser huesos largos y anchos resulta más sencillo obtener gran cantidad de células a partir de ellos. Para extraer la médula ósea de estos huesos, cortamos la pata del ratón a la altura de la cadera, desgarramos la piel para dejar el músculo al descubierto y eliminamos la parte del pie. Tras colocar la pata en una placa Petri estéril de plástico con medio de cultivo DMEM y con ayuda del bisturí, raspamos el músculo para eliminar la mayor parte y dejar el hueso al descubierto. Cortamos el hueso a la altura de la rótula para separar el fémur de la tibia. Un breve baño en etanol nos ayudará a reblandecer el tejido muscular para eliminarlo completamente. Cortamos totalmente las epífisis de los huesos para poder acceder al interior donde se encuentra la médula. Con una aguja y una jeringuilla perfundimos 5 ml de medio DMEM en el interior del hueso y expulsamos la médula. Dejamos que la médula caiga sobre un filtro de 40 µm Nylon Cell Strainer (BD Falcon, 352340) colocado sobre un tubo Falcon de 50 ml. Disgregamos los posibles grumos de médula sobre el filtro. Tras lavar las células centrifugando a 300g 5 minutos a 4°C, se contabilizaron las células viables por tinción con el colorante azul de Trypan 0,4% en PBS, empleando una cámara de Neubauer (Brand). Las células se sembraron a distinta concentración según el experimento que se fuera a realizar posteriormente.

3. Material y métodos

b) Determinación del estrés oxidativo

Este ensayo se realiza mediante citometría de flujo y se basa en que las células polimorfonucleares se pueden estimular utilizando un compuesto no fluorescente, el cual debe ingresar en el interior del fagocito. En presencia de diversas ROS este compuesto es transformado en una molécula fluorescente. La fluorescencia así emitida, es detectada por el citómetro de flujo. El fluorocromo más utilizado para medir el estrés oxidativo intracelular es 123-Dihidrorrodamina (123-DHR). Esta molécula es un cromógeno permeable capaz de entrar en la célula y ser convertido en 123-rodamina en presencia de ROS, excitable a 488 nm y que emite a 515 nm. Una vez oxidada a 123-rodamina se localiza en las mitocondrias y puede ser detectada y cuantificada por citometría de flujo. La conversión de molécula no fluorescente a fluorescente depende completamente de los productos de oxidación y no requiere catálisis enzimática (Robinson y Babcock 1998). Además de detectar la producción de 123-Rodamina, la citometría de flujo nos permite identificar qué células son responsables de su producción mediante el uso de anticuerpos de superficie, marcados fluorescentemente, específicos para cada tipo celular.

En este ensayo hemos estudiado la capacidad que tienen las células provenientes de médula ósea de generar 123-Rodamida.

Las células se sembraron a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/pocillo en placa de 96 pocillos y se dejaron adherir durante al menos 2 horas. Pasado este tiempo, se añadió la 123-DHR a una concentración final de 5 μ M durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente se adicionó como estímulo exógeno inflamatorio PMA, inductor de la activación celular a 200 ng/ml durante 30-40 min a 37°C. Tras lavar la placa un par de veces con PBS centrifugando a 300g 5 minutos a 4°C, se resuspendió el pellet en 500 μ l de PBS, y se midió en el citómetro de flujo (FACSCanto, Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA).

c) Diferenciación de osteoclastos

El osteoclasto es una célula multinucleada, móvil, de gran tamaño, que degrada, reabsorbe y remodela el hueso. Los osteoclastos se forman por la fusión de varias células mononucleares derivadas de una célula madre sanguínea de la médula ósea,

3. Material y métodos

conservando muchas de las propiedades de los macrófagos, ya que forman parte del sistema monocito-macrófago.

Los osteoclastos se caracterizan por poseer una porción de su membrana "arrugada", en forma de cepillo, rodeada de un citoplasma libre de orgánulos llamada "zona clara", con la que se adhiere a la superficie del hueso mediante integrinas, unos receptores especializados del hueso. Las enzimas lisosomales de los osteoclastos implicadas en este proceso son cistein-proteasas como la catepsina y sobre todo, la fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP-5b) que se utiliza como marcador del fenotipo osteoclástico (Clarke 2008).

Protocolo experimental

Las células procedentes de médula ósea fueron sembradas en placa de 96 pocillos a una concentración de $0,25 \times 10^6$ células/pocillo. Pasadas al menos 2 horas después de sembrarlas, las células no adheridas se retiraron y se adicionó medio DMEM 10% completo, suplementado con dos estímulos necesarios para diferenciar las células provenientes de médula ósea a osteoclastos. Estos estímulos son por un lado, 100 ng/ml de RANK-L (Peprotech, EC Ltd. Londres, Reino Unido), una importante molécula del metabolismo óseo y por otro lado, 30 ng/ml del factor estimulante de colonias de macrófagos o M-CSF (Peprotech) que promueve la maduración de células precursoras localizadas en la médula ósea a macrófagos. Este medio con los estímulos se renovó cada 3 días.

d) Tinción de osteoclastos mediante la detección de TRAP-5b

Esta tinción se basa en la actividad fosfatasa ácida tartrato resistente que presentan los osteoclastos. Existen varias isoenzimas de la fosfatasa ácida. Cuando se añade ácido tartárico, todas las isoenzimas se inhiben, excepto la isoenzima 5 que está presente únicamente en las células pilosas como osteoclastos y no en el resto de células sanguíneas. Esta enzima hidroliza el sustrato ácido fosfórico naftol AS-MX (Sigma). Una vez hidrolizado, este sustrato se acopla con un colorante, como la sal de *Fast red violet* LB (Sigma) y produce un precipitado morado-fucsia en el lugar de la reacción enzimática (Rodak, 2005) (figura 22).

3. Material y métodos

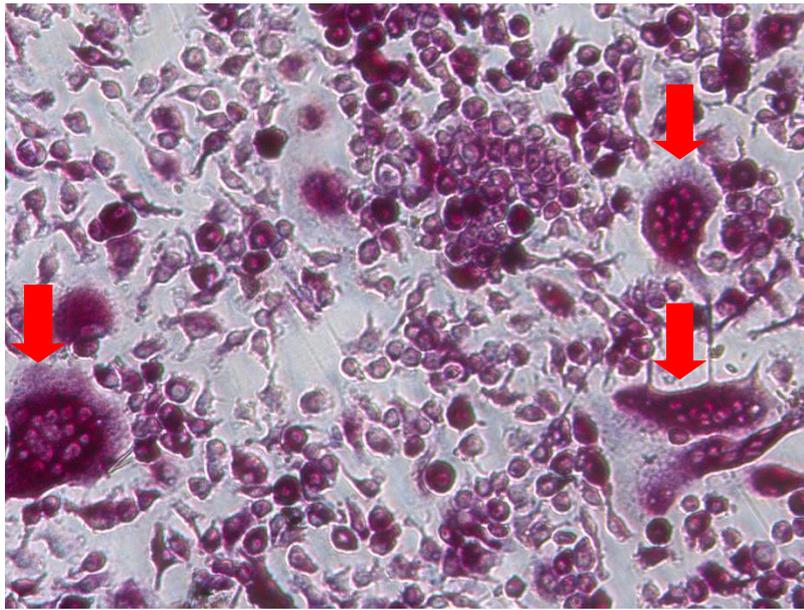


Figura 22. Osteoclastos teñidos con tinción TRAP-5b.

Protocolo experimental

Una vez las células de médula ósea han sido estimuladas con RANK-L y M-CSF durante 7 días, se realiza la tinción TRAP-5b para visualizar los osteoclastos. Para ello, primero retiramos el medio a las células, lavamos con PBS y las fijamos en paraformaldehído 2% durante 5 minutos. Tras lavar de nuevo, adicionamos al pocillo la solución 1 que contiene el ácido tartárico y dejamos incubando 20 minutos a 37°C. Volvemos a lavar las células y añadimos la solución 2, incubando 3 horas a 37°C. Pasado este tiempo, las células se lavan con PBS y se lleva a cabo una contratinción con azul de anilina 0,1% (Sigma) durante 20 segundos. Este colorante tiñe de azul los citoplasmas de las células. También realizamos una segunda contratinción con hematoxilina 10% (Sigma) para colorear los núcleos de las células de rosa.

Solución TRAP 1 (pH5): Acetato de Sodio 0,2 M, ácido tartárico 0,05 M y agua destilada

Solución TRAP 2: Naftol AS-MX fosfato, Fast red violet LB salt y agua destilada

Al realizar esta tinción, los osteoclastos se marcan de color fucsia y las demás células tienen coloreados sus núcleos de rosa por la hematoxilina y el citoplasma de azul claro por el azul de anilina.

3. Material y métodos

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En cada experimento los resultados se expresaron como media aritmética de los valores \pm S.E.M (error estándar de la media ϵ); n representa el número de animales por grupo. Para saber el grado de significatividad estadística, el test estadístico utilizado varió en función de los datos analizados:

1. Para comparar distintos grupos experimentales con respecto a un grupo control, los valores obtenidos en cada experimento fueron sometidos a un tratamiento estadístico empleando el método ANOVA simple de una vía y la t de Dunnett para comparaciones múltiples. El método de Dunnett (Dunnett, 1964) permite comparar los valores medios obtenidos para varios grupos problema respecto a un único grupo control en un mismo experimento. Pero si queremos comparar todos los grupos entre sí, utilizamos el método de ANOVA simple de una vía y el test de Tukey. En el caso de querer comparar pares de grupos (ej: animales artríticos de distintos genotipos con sus respectivos animales naïve) lo haremos mediante el test de Sidak. En los tres casos, se tiene en cuenta el error asociado a las comparaciones múltiples. Se considera que la diferencia entre los grupos tratados y el grupo control es significativa ($P < 0,05$) cuando el valor de t obtenido es mayor que el tabulado para un margen de confianza del 95% y muy significativa ($P < 0,01$) cuando es mayor del 99%. Se utilizó el símbolo (*) para representar la significatividad estadística de los animales artríticos (o estimulados con zimósán en el experimento de Bolsa de aire) frente a los animales sanos (grupo blanco) (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$). El símbolo (#) representó la significatividad estadística de los animales artríticos (o estimulados con zimósán, en el caso de MAP) modificados genéticamente frente a los animales artríticos del grupo control *wild type* (# $P < 0,05$, ## $P < 0,01$).

2. Para la comparación de varios tratamientos/genotipos a lo largo del tiempo se utilizó el método ANOVA de dos vías (variable 1: tiempo; variable 2: tratamiento o genotipo) seguido del test de Tukey para comprar todos los grupos entre sí, el test de Dunnett para comparar varios grupos respecto a un grupo control o el test de Sidak, para comparar pares de grupos. Se utilizó el símbolo (*) para representar la significatividad

3. Material y métodos

estadística de los animales artríticos modificados genéticamente frente a los animales artríticos del grupo control *wild-type* (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

3. Para las comparaciones entre dos medias muestrales independientes y datos paramétricos se empleó el test de la t de Student (t Test). Se utilizó el símbolo (* o #) para representar la significatividad estadística respecto al control correspondiente (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ o # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$). La ausencia de símbolo indica que no hubo diferencias significativas.

En el caso de resultados obtenidos a partir de una muestra biológica por mediciones repetidas de la misma, se correlacionaron o emparejaron los datos (test pareado o *paired test*).

3. Material y métodos

3.4 TAMPONES DE USO GENERAL, SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO CELULAR

- *Paraformaldehido 4%: paraformaldehido 40 g/l en tampón salino fosfato (PBS) pH7,4*
- *Ácido fórmico: 5% en H₂O destilada pH 7,3.*
- *EDTA 10%: Tris (hidroximetilaminometano) 12,1 g/l; EDTA (ácido etilendiamino-tetraacético disódico dihidratado) 100 g/l; NaOH 10N 20 ml y H₂O ultrapura c.s.p 1L pH 7,3.*
- *Tampón PBS 0,02M (10X) para ELISA: KH₂PO₄ 10,9 g/l; Na₂HPO₄·2H₂O 10,9 g/l; NaCl 90 g/l en H₂O ultrapura pH 7,2.*
- *Tampón de lavado para ELISA: PBS con Tween-20 0,1%.*
- *Tampón de bloqueo para ELISA: PBS con BSA 10%.*
- *Tampón PBS (10X) para células: NaCl 80 g/l; Na₂HPO₄ 11,6 g/l; KH₂PO₄ 2 g/l; KCl 2 g/l en H₂O ultrapura pH 7,4.*
- *Suero fisiológico: NaCl 9 g/l en H₂O ultrapura.*
- *Tampón de contaje para el contador automático de células: NaCl 36 g/l, azida sódica 4 g/l en H₂O ultrapura.*
- *Tampón para citometría de flujo: Suero bovino fetal (SBF) 1%, azida sódica 0,05% en PBS.*
- *Tampón de lavado para citometría de flujo: 0,1% Tritón X-100 en PBS.*
- *Tampón de lisis de eritrocitos (ACK): NH₄Cl 8,3 g/l; KHCO₃ 1 g/l; Na₂EDTA 37,2 mg/l pH 7,2.*
- *Tampón de permeabilización de células: Tritón X-100 0,1% en PBS.*
- *Medio DMEM completo: Medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium, PAA) suplementado con SBF 10% (Gibco), penicilina (100 U/ml, Gibco), estreptomocina (100 µg/ml, Gibco). El DMEM completo se ha utilizado para el cultivo de macrófagos peritoneales y células de médula ósea.*
- *Medio RPMI completo: Medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute médium-1640, PAA) suplementado con SBF 10%, penicilina (100 U/ml), estreptomocina (100 µg/ml), L-glutamina (2 mM), β-mercaptoetanol (50 µM, Gibco). El RPMI completo se ha utilizado para el cultivo de linfocitos de ganglios y bazo.*

El suero bovino fetal utilizado en todos los medios de cultivo se inactiva por calor a 56°C durante 30 minutos antes de ser añadido a los medios.

Resultados

4.1 ESTUDIO Y ADAPTACIÓN DEL MODELO DE ARTRITIS POR TRANSFERENCIA DE SUERO K/BxN

Hoy en día, está muy extendido el uso de ratones modificados genéticamente para el estudio de gran variedad de enfermedades. En ese ámbito, es necesario trabajar con modelos animales que admitan cepas de ratón susceptibles de dichas alteraciones genéticas, como es el caso de la cepa C57BL/6. En el caso concreto de la AR, como vimos en la Introducción, apartado 1.2, existen varios modelos animales para el estudio de dicha enfermedad, los dos más comunes son: el **modelo por transferencia de suero K/BxN**, que es un modelo que mimetiza la fase efectora de esta enfermedad, sin implicación de la inmunidad adaptativa, y que se desarrolla en una amplia variedad de cepas de ratón, y en segundo lugar encontramos el modelo de **artritis inducida por colágeno (CIA)**. Este último, es un modelo crónico de artritis, ampliamente utilizado, y en el que participa tanto la inmunidad innata, como la adaptativa. Sin embargo, el modelo de CIA tiene el inconveniente de que sólo se desarrolla en cepas de ratón susceptibles inmunológicamente, siendo la más empleada la cepa DBA-1J, que ofrece muy pocas opciones a la modificación genética de estos individuos. En la bibliografía existen casos, en los que se han utilizado ratones C57BL/6 para desarrollar el modelo de CIA, sin embargo, la incidencia de la artritis y la severidad de la misma es muy baja en estos ratones, convirtiéndolo en un modelo poco útil en caso de trabajar con ratones modificados genéticamente. Por ese motivo, vimos necesario estudiar un modelo de artritis experimental, que fuese crónico, y que permitiese trabajar con ratones cuyo fondo fuera la cepa C57BL/6.

Estudiamos la manera de cronificar el modelo de artritis por transferencia de suero K/BxN, ya que este modelo ofrece ciertas ventajas respecto al modelo CIA. Entre estas ventajas destaca el hecho de que se desarrolla de forma muy agresiva en los tobillos de los ratones C57BL/6, con una alta incidencia, y que afecta únicamente a la inmunidad innata, ya que el suero K/BxN contiene los anticuerpos que se unen a la GPI y que causan el inicio de la enfermedad, simplificando el estudio de la misma (véase Introducción, apartado 1.2.1 y 1.2.2).

4. Resultados

4.1 Estudio y adaptación del modelo de artritis por transferencia de suero K/BxN

Como hemos visto anteriormente, el modelo original, consiste en inmunizar al ratón con el suero K/BxN los días 0 y 2, lo que determina la rápida inducción del proceso artrítico que alcanza el día 10 el máximo de inflamación en los tobillos de los animales. Este procedimiento es el que desarrollamos en los ratones control de este estudio. Para convertir este modelo en crónico, alargamos el proceso artrítico realizando varias reinmunizaciones con este suero a distintos tiempos (ver Material y métodos, apartado 3.1.2.3). Adicionalmente trabajamos con un grupo de ratones llamado *resolución*, que no recibe estas dosis extra de suero K/BxN, sino que en su lugar se le administra suero fisiológico. Este grupo nos permitirá estudiar cómo evoluciona el proceso artrítico sin la reinmunización de los ratones con los anticuerpos antiGPI. El grupo control, que representa el modelo original, nos servirá como referencia para compararlo con el grupo *resolución* y el grupo *crónico*.

4.1.1 Variación de peso y puntuación macroscópica tras inducir la artritis

Durante el desarrollo de la artritis, los animales van sufriendo una ligera pérdida de peso. A partir del sexto día, empiezan a observarse diferencias significativas entre el peso de los ratones artríticos y los naïve debido a que en el día 6 tras la inducción de la enfermedad, ya son visibles los efectos de la artritis, que producen inapetencia y dificultad en los ratones para alimentarse. En este aspecto, los animales sanos van incrementando de peso con el tiempo, mientras que en los ratones artríticos observamos esta pérdida inicial causada por la enfermedad, y posteriormente un aumento progresivo de peso a medida que avanzan los días aunque este aumento es significativamente más moderado que en los ratones sanos. A pesar de la enfermedad, los ratones mantuvieron un peso saludable (Figura 23).

La valoración de la artritis se realizó como hemos visto anteriormente en el apartado de Material y métodos 3.1.2.2. Observamos cómo los 3 grupos de ratones artríticos alcanzan la misma puntuación a día 10 del proceso artrítico. A partir de ese momento, los ratones control son sacrificados, mientras que los grupos *crónico* y *resolución* continúan hasta el día 30. La gráfica 24, muestra como los ratones crónicos mantienen

elevada la puntuación artrítica, mientras que los ratones del grupo resolución, se recuperan hasta alcanzar los niveles iniciales.

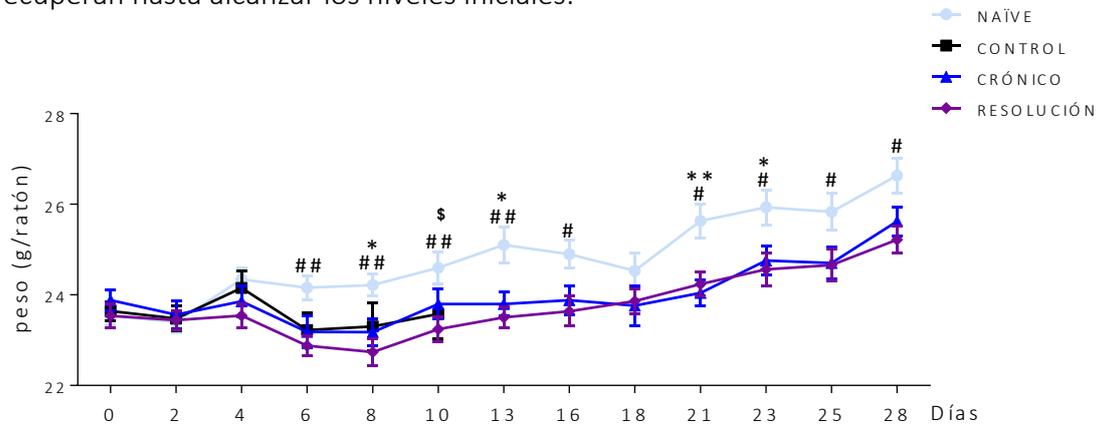


Figura 23. Variación de peso en los ratones al provocar el proceso artrítico. Durante el desarrollo de la artritis, los ratones no incrementan su peso de la misma forma que los ratones sanos. Valores representados como media \pm S.E.M, $n=8-9$. * $P<0,05$; ** $P<0,01$ grupo de animales crónico en comparación con el grupo de animales no artríticos o naïve. # $P<0,05$; ## $P<0,01$; grupo resolución comparado con el grupo naïve. \$ $P<0,05$; grupo de animales control en comparación con el grupo de animales naïve ANOVA (dos vías), test de Dunnett.

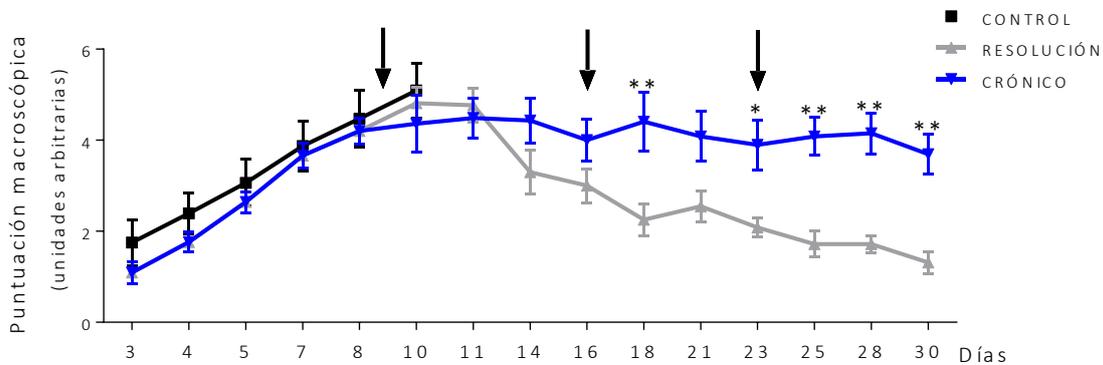


Figura 24. Puntuación macroscópica. La puntuación macroscópica se llevó a cabo visualmente utilizando una escala de 0-2 para las patas delanteras y traseras. Puntuación máxima por ratón: 8. Señalados con flechas los días donde se reinmunizan los ratones con suero K/BxN. Valores representados como media \pm S.E.M, $n=8-9$. * $P<0,05$; ** $P<0,01$ en comparación con los animales artríticos del grupo resolución. ANOVA (dos vías), test de Sidak.

Estas diferencias en la gravedad de la artritis entre los ratones crónicos y del grupo resolución, son visibles también si analizamos por separado las patas delanteras y traseras de los animales (Figura 25). A partir del día 11, los ratones del grupo resolución

4. Resultados

4.1 Estudio y adaptación del modelo de artritis por transferencia de suero K/BxN

empiezan a recuperarse, disminuyendo los parámetros de la enfermedad, mientras que los ratones crónicos mantienen altos valores artríticos. Vemos por tanto, que si los ratones no reciben sucesivas dosis de suero K/BxN, consiguen recuperarse de la artritis. Sin embargo, los ratones crónicos, mantienen una puntuación macroscópica elevada, aunque los signos de la enfermedad van variando: la inflamación va disminuyendo dejando paso a la deformación de sus articulaciones, que afecta principalmente a los huesos de dedos, tobillos y muñecas, como puede observarse en las imágenes de la figura 26. Este proceso es muy similar al que ocurre en los pacientes que padecen esta enfermedad y que van observando como sus miembros se deforman progresivamente.

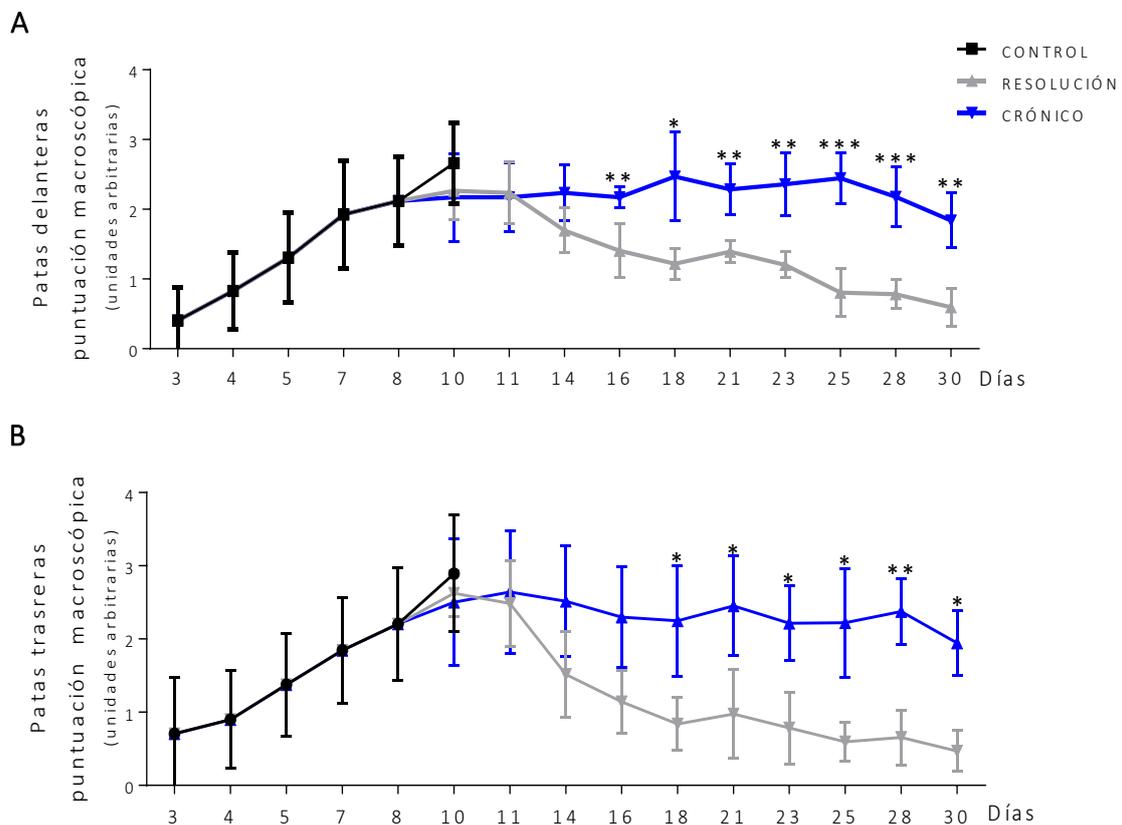


Figura 25. Puntuación macroscópica de patas delanteras (A) y traseras (B). La puntuación macroscópica se llevó a cabo visualmente utilizando una escala de 0-2 para las patas delanteras y traseras. Valores representados como media \pm S.E.M, $n=8-9$. * $P<0,05$; ** $P<0,01$ en comparación con los animales artríticos del grupo resolución. ANOVA (dos vías), test de Sidak.

En las imágenes siguientes podemos comparar la evolución del proceso artrítico en las patas delanteras y traseras de los ratones. Observamos que la inflamación en el grupo crónico disminuye parcialmente, pero lo más llamativo es la deformación y la atrofia de sus patas, que impiden al ratón separar los dedos o mover fácilmente sus extremidades.

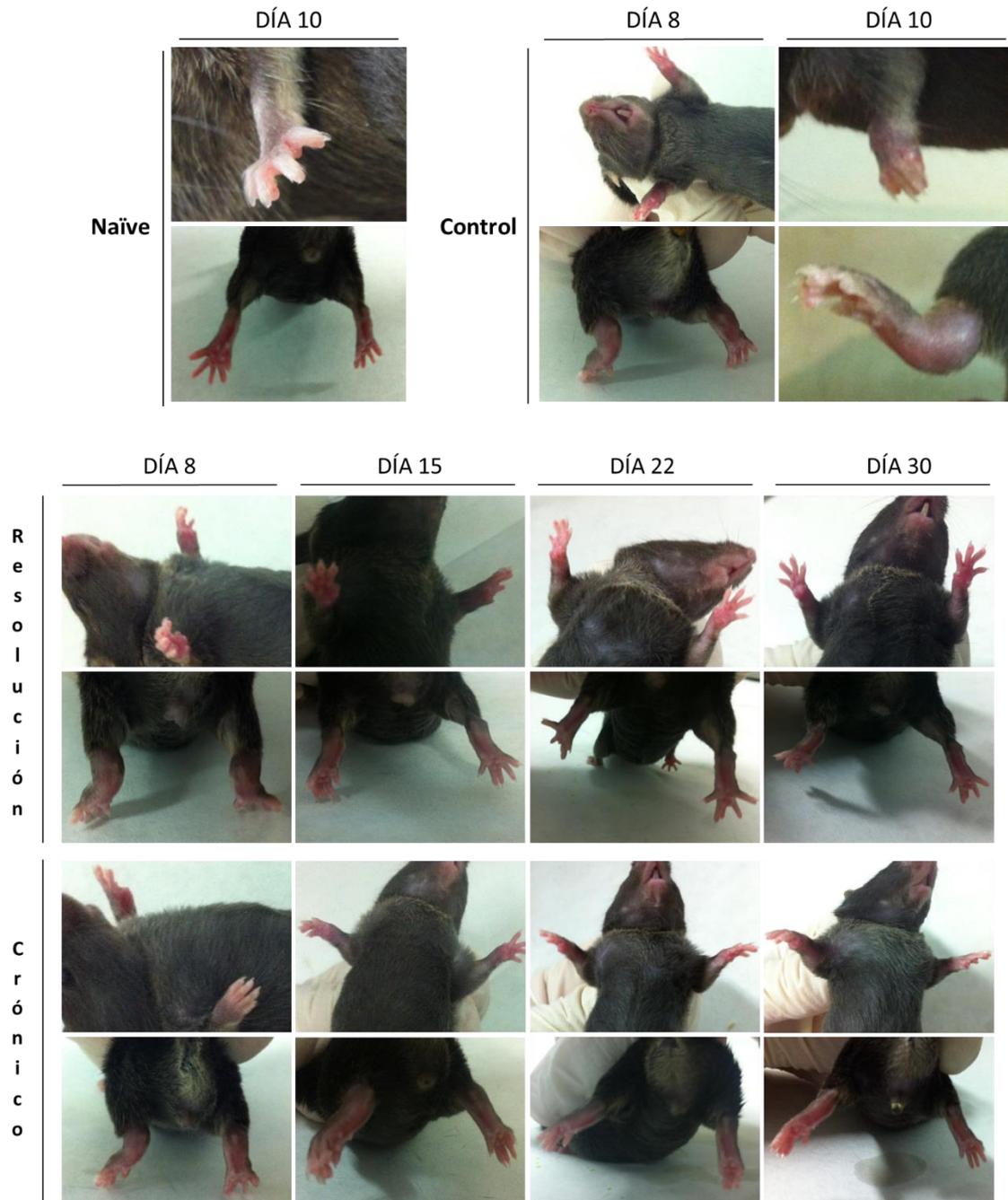


Figura 26. Fotografías de las patas delanteras y traseras de los ratones sanos y artríticos de los 3 grupos en estudio. Las fotografías se realizaron a día 8, 10, 15, 22 y 30 del proceso artrítico.

4. Resultados

4.1 Estudio y adaptación del modelo de artritis por transferencia de suero K/BxN

4.1.2 Niveles de mediadores inflamatorios en homogeneizado de pata de ratón

Al analizar los mediadores inflamatorios más habituales en los procesos inflamatorios, observamos que los mediadores que están implicados principalmente en la fase temprana, como la IL-1 β , la MMP-3, CXCL-1 y PGE₂ están muy elevados en el grupo control con respecto al resto de grupos (Figuras 27 y 28).

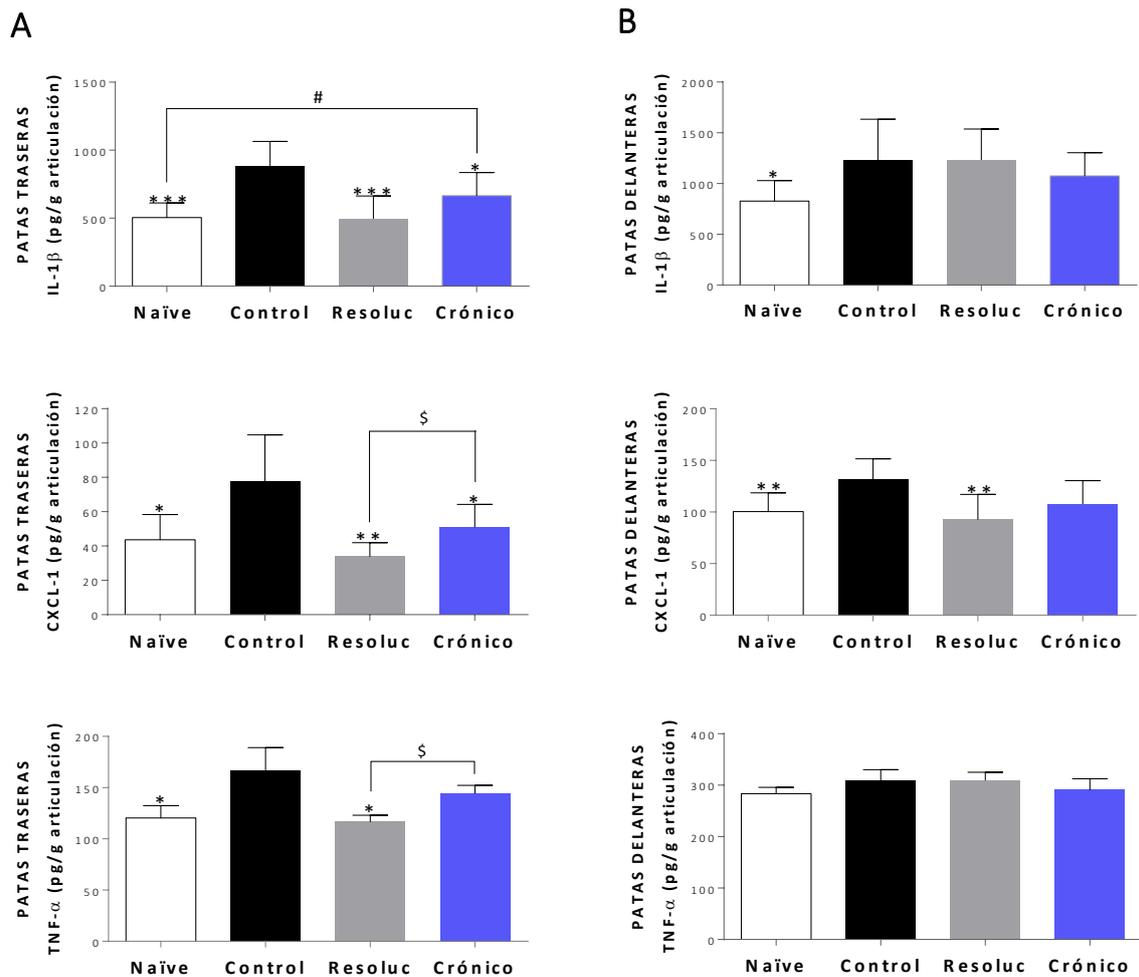


Figura 27. Niveles de mediadores inflamatorios analizados en homogeneizado de las patas traseras (A) y delanteras (B). Datos representados como media \pm S.E.M (naïve: n=12 y artríticos: n=8). *P<0,05; **P <0,01; ***P<0,001 comparado con el grupo control. #P<0,05; ##P<0,01, comparando el grupo crónico y resolución con el grupo naïve. §P<0,05 comparando crónico respecto al grupo resolución. ANOVA de una vía seguido del test de Tukey.

Sin embargo, si analizamos los resultados obtenidos en las **patas traseras**, observamos como en todos los mediadores, los valores del grupo crónico son valores intermedios

entre el grupo control y resolución, mostrando diferencias significativas con el grupo de ratones sanos y/o con el grupo resolución.

Por tanto, en el grupo crónico se mantienen niveles elevados de la mayoría de estos mediadores a día 30 del proceso artrítico. A ese mismo tiempo no se detectan diferencias significativas entre los ratones naïve y resolución en los niveles de estos mediadores inflamatorios (Figura 27 y 28).

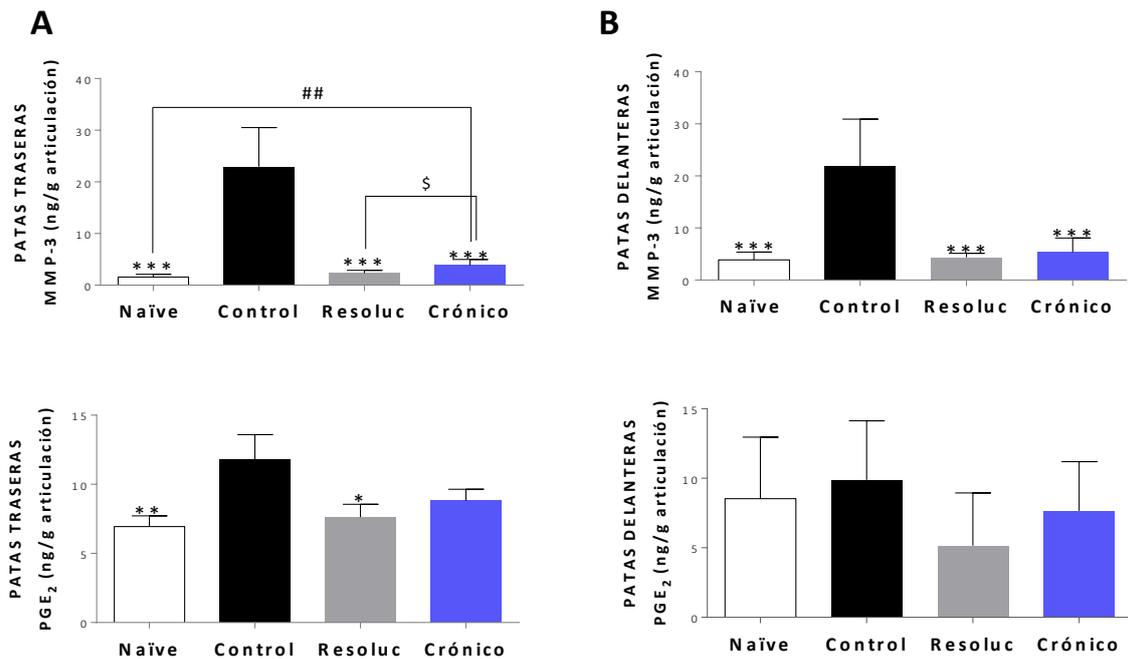


Figura 28. Niveles de mediadores inflamatorios analizados en homogenizado de las patas traseras (A) y delanteras (B). Datos representados como media \pm S.E.M (naïve: $n=12$ y artríticos: $n=8$). * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$ comparado con el grupo control. # $P<0,05$; ## $P<0,01$, comparando el grupo crónico y resolución con el grupo naïve. § $P<0,05$ comparando crónico respecto al grupo resolución. ANOVA de una vía seguido del test de Tukey.

Las citocinas **IL-1 β** y **TNF α** son los mediadores fundamentales del proceso inflamatorio y artrítico, y ejercen acciones sinérgicas en la patogénesis de la enfermedad, favoreciendo la cronicidad de la misma (Feldmann y Maini 2008). Ambas citocinas liberadas principalmente por macrófagos y linfocitos son responsables de inducir la síntesis de quimiocinas, como IL-8 (CXCL-1 en ratón) e incrementar la producción de enzimas degradativas, como las MMPs que degradan la matriz extracelular del cartílago. Además TNF α es un estímulo importante para las células productoras de mediadores

4. Resultados

4.1 Estudio y adaptación del modelo de artritis por transferencia de suero K/BxN

inflamatorios como la PGE₂. La PGE₂ que es un potente vasodilatador, está implicado en el enrojecimiento, la hinchazón y el dolor que sigue a la inflamación aguda (Dieguez-Gonzalez et al. 2009).

Los valores, en pata trasera, de TNF α , citocina importante en la fase más tardía del proceso inflamatorio, se mantienen elevados en el grupo crónico, mostrando diferencias significativas respecto al grupo resolución. También hay un aumento significativo de MMP-3 y CXCL-1 en el grupo crónico respecto al grupo resolución.

En las **patas delanteras**, la IL-1 β , PGE₂ y TNF α no muestran diferencias significativas en los grupos resolución y crónico, con respecto al grupo control. Los niveles de MMP-3 en el grupo control son muy elevados en comparación con el resto de grupos, y referente a los valores de CXCL-1, esta citocina, posee niveles elevados a día 10 del proceso artrítico (grupo control), y estos niveles disminuyen ligeramente en el grupo crónico, pero sin ofrecer diferencias significativas con este grupo, aunque sí con los ratones del grupo resolución.

Por tanto, mediante la reinmunización de los ratones, conseguimos que a día 30 del proceso artrítico y principalmente en patas traseras, la gran mayoría de los mediadores inflamatorios permanezcan elevados, incluso los que participan en las fases tempranas del proceso inflamatorio.

4.1.3 Estrés oxidativo en células de médula ósea

Tras sacrificar a los ratones a sus tiempos correspondientes, obtuvimos sus patas traseras y delanteras, que utilizamos para la determinación de mediadores inflamatorios en el homogeneizado de las mismas, y para estudios de histología e inmunohistoquímica. Además utilizamos también las células procedentes de médula ósea para analizar el estrés oxidativo en estas células (ver Material y métodos 3.2.2 b).

Los ratones control, sacrificados a día 10 desde la inducción de la artritis, mostraban niveles de estrés oxidativo superiores a los ratones sanos. El grupo resolución, que se sacrificó a día 30, también presentó diferencias significativas respecto a los ratones sanos sacrificados ese mismo día, no siendo así para el grupo crónico (Figura 29).

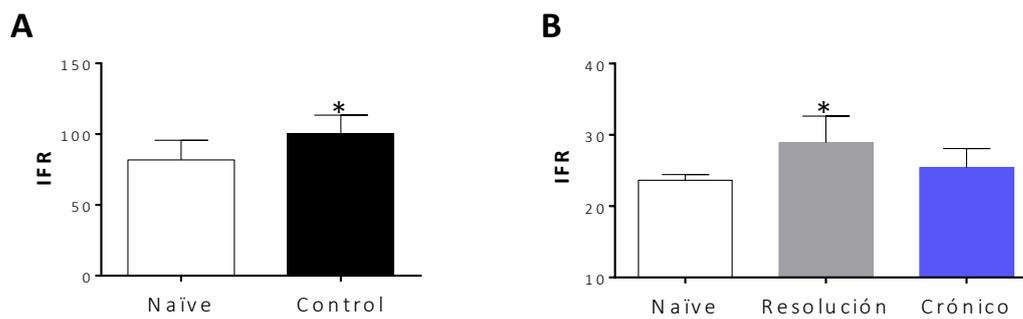


Figura 29. Valores de estrés oxidativo analizados en células extraídas de médula ósea de ratón. A: animales sacrificados a día 10, B: animales sacrificados a día 30. IFR (intensidad de fluorescencia relativa) Valores representados como media \pm SD. * $p < 0,05$; en la gráfica A comparado con el grupo naïve mediante el test de la t de Student (two tailed), y en la gráfica B ANOVA de una vía seguido del test de Tukey.

4.1.4 Histología de tobillo en los grupos control, resolución y crónico del modelo artrítico K/BxN

El estudio histológico se realizó según se describe en el apartado de Material y métodos 3.1.4.1, con tinciones de hematoxilina/eosina y de safranina O/Fast Green en la articulación del tobillo.

En cuanto a la **infiltración celular** en la articulación del tobillo, observamos que en el grupo control, existían altos niveles de células en el espacio sinovial y en la membrana sinovial, resultado del grave proceso inflamatorio que presentan estos animales a día 10 desde la inducción del proceso artrítico. En el grupo crónico, aunque el infiltrado y exudado celular era menor, aún se mantenían ciertos niveles de estos marcadores inflamatorios, y en el grupo resolución estos valores eran prácticamente iguales a los de los animales sanos, es decir, nulos (Figura 30). Todos estos datos se correspondían con lo observado anteriormente en la puntuación macroscópica (apartado 4.1.1).

En el estudio del cartílago, destaca la fuerte **depleción de proteoglicano** que padecen los ratones a día 10 del proceso artrítico, consumiendo prácticamente la primera capa que conforma el cartílago articular del calcáneo y la tibia. Esta depleción es visible también al cronificar el modelo artrítico hasta el día 30. Sin embargo, los ratones del grupo resolución han regenerado prácticamente en su totalidad este proteoglicano tan afectado en la fase aguda de la enfermedad.

4. Resultados

4.1 Estudio y adaptación del modelo de artritis por transferencia de suero K/BxN

Es llamativa la erosión del cartílago y la pérdida de los condrocitos en el grupo crónico, que se produce en menor medida a día 10 del proceso artrítico, como vemos en las imágenes del grupo control, ya que este proceso es más común en estadios avanzados.

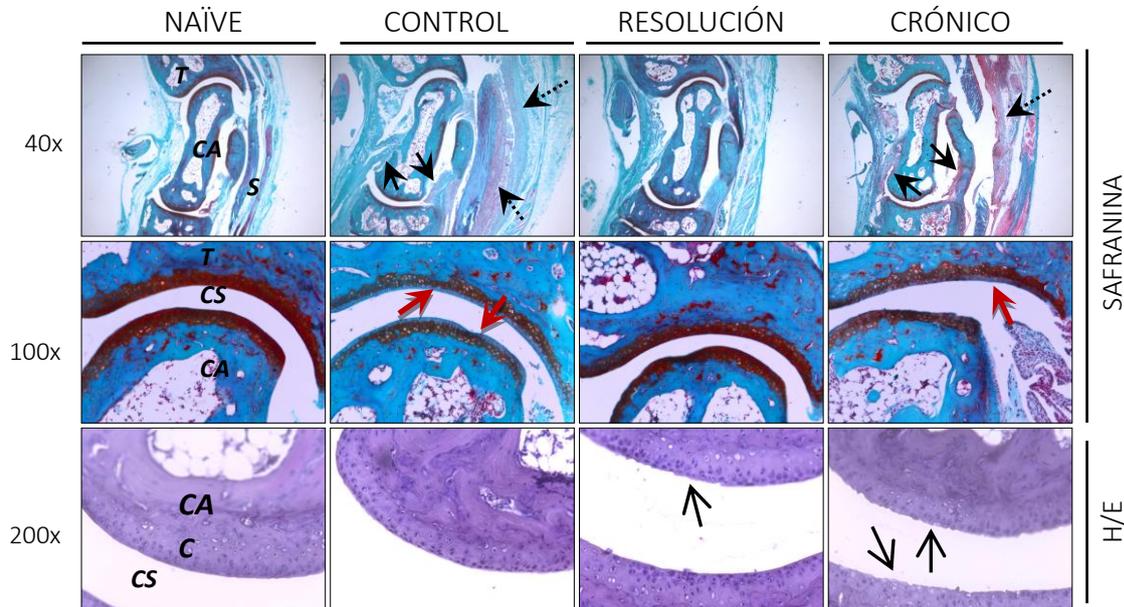


Figura 30. Fotografías del análisis histológico de patas traseras teñidas con safranina O/Alcian blue o hematoxilina/eosina (H/E). Magnificación 40x, 100x y 200x. Señalizados con flecha punteada: el infiltrado celular, con flecha negra y punta negra: el exudado celular, con flecha roja: la depleción del proteoglicano del cartílago y con flecha negra con punta fina: la erosión del cartílago. T= tibia, CA= calcáneo, C= cartílago, S= membrana sinovial, CS= cavidad sinovial.

En la gráfica siguiente (31) podemos analizar de forma cuantitativa los datos observados en las fotografías de las secciones de tobillo. Según este análisis, los valores de infiltrado y exudado celular en la membrana y espacio sinovial son muy elevados en el grupo control, mostrando diferencias significativas con el resto de grupos. Esto se debe a que a día 10 del proceso artrítico, la infiltración celular en la articulación era máxima, pero a día 30, aunque ha disminuido, todavía se mantienen valores de infiltrado y exudado celular importantes en el grupo crónico. La afectación del proteoglicano del cartílago articular se ve deteriorada por igual en el grupo control y en el grupo crónico, por tanto se prolonga esta afectación hasta el final del proceso.

Los condrocitos del cartílago empiezan a desaparecer cuando el cartílago está muy afectado. En este modelo de artritis experimental, no observamos mucha pérdida de condrocitos en los animales artríticos, pero ésta es significativamente mayor respecto a los animales sanos, a día 10 del modelo artrítico. Por otro lado, la erosión del cartílago, parece ser mayor en el grupo crónico que en el resto de grupos. Por tanto, este proceso erosivo se incrementa al cronificar el modelo artrítico.

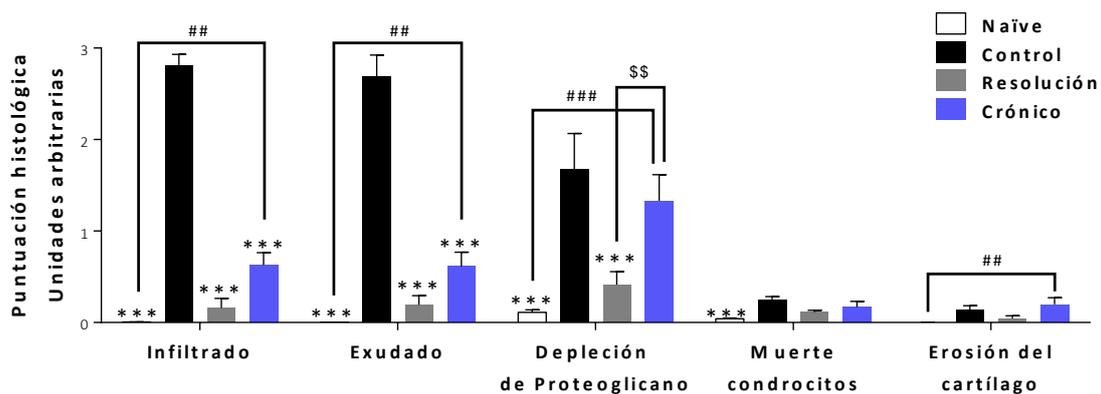


Figura 31. Análisis histológico cuantitativo. Valores de infiltrado, exudado celular, depleción de proteoglicano, erosión de cartílago y muerte de condrocitos en la articulación de tobillo, valorados en una escala de 0-3. Datos representados como media \pm S.E.M. (naïve: n=12, control: n=8, resolución: n=8, crónico: n=9) ***P <0,001 comparado con el grupo control. ##P<0,01; ###P<0,001 si comparamos el grupo crónico y resolución con el grupo naïve. \$\$\$p<0,01 al comparar crónicos y resolución. ANOVA, test de múltiple comparación Tukey.

Durante el análisis histológico se identificaron, en el grupo de ratones crónico, varias formaciones de osteofitos, es decir, zonas de crecimiento anómalo de hueso que aparecen cuando existe mucha infiltración y destrucción ósea y que no son comunes en la fase aguda del modelo artrítico por transferencia de suero K/BxN (Figura 32). Estos osteofitos se producen en fases más tardías, cuando la afectación de la articulación ocasiona una calcificación del tejido blando que intenta compensar la degeneración producida en el hueso. Esta formación anómala de hueso, que únicamente se produce en los ratones del grupo crónico, es muy común en los pacientes que sufren AR.

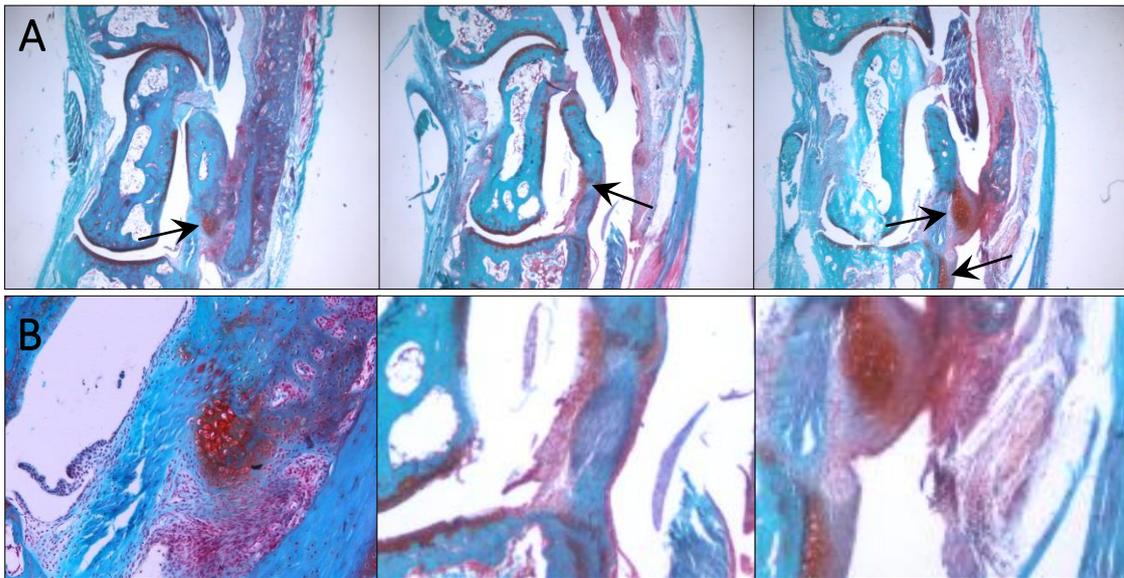


Figura 32. Imágenes de osteofitos en ratones artríticos. Fotografías de cortes histológicos de tobillo en ratones del grupo crónico a día 30 del proceso artrítico teñidos con Safranina O/Alcian Blue. Fila A, señalizada la formación de osteofitos. (vista 40x) y ampliado a 100x en fila B.

4.1.5 Análisis inmunohistoquímico en sección articular de tobillo en ratones control, crónico y resolución

La tinción inmunohistoquímica, nos permite ver la expresión en el tejido de ciertas proteínas. En este caso, realizamos la tinción de las secciones de tobillo para estudiar la expresión de la enzima HO-1, en los condrocitos del cartílago. Como hemos indicado anteriormente, esta enzima puede participar de forma crucial en el control de los procesos inflamatorios. En las fotografías de la figura 33, podemos observar que los condrocitos que expresan HO-1 se tiñen de color marrón. Esta tinción es llamativa en el grupo control y crónico, siendo su expresión superior en este último grupo. De manera que tras cronificar el modelo artrítico, la expresión de HO-1 se ve incrementada en los condrocitos del cartílago afectado. Sin embargo, no se expresa en el grupo de resolución. Únicamente detectamos la presencia de HO-1 ante estímulos inflamatorios. Una vez restaurado el equilibrio tras el proceso artrítico en la articulación, la expresión de esta enzima desaparece.

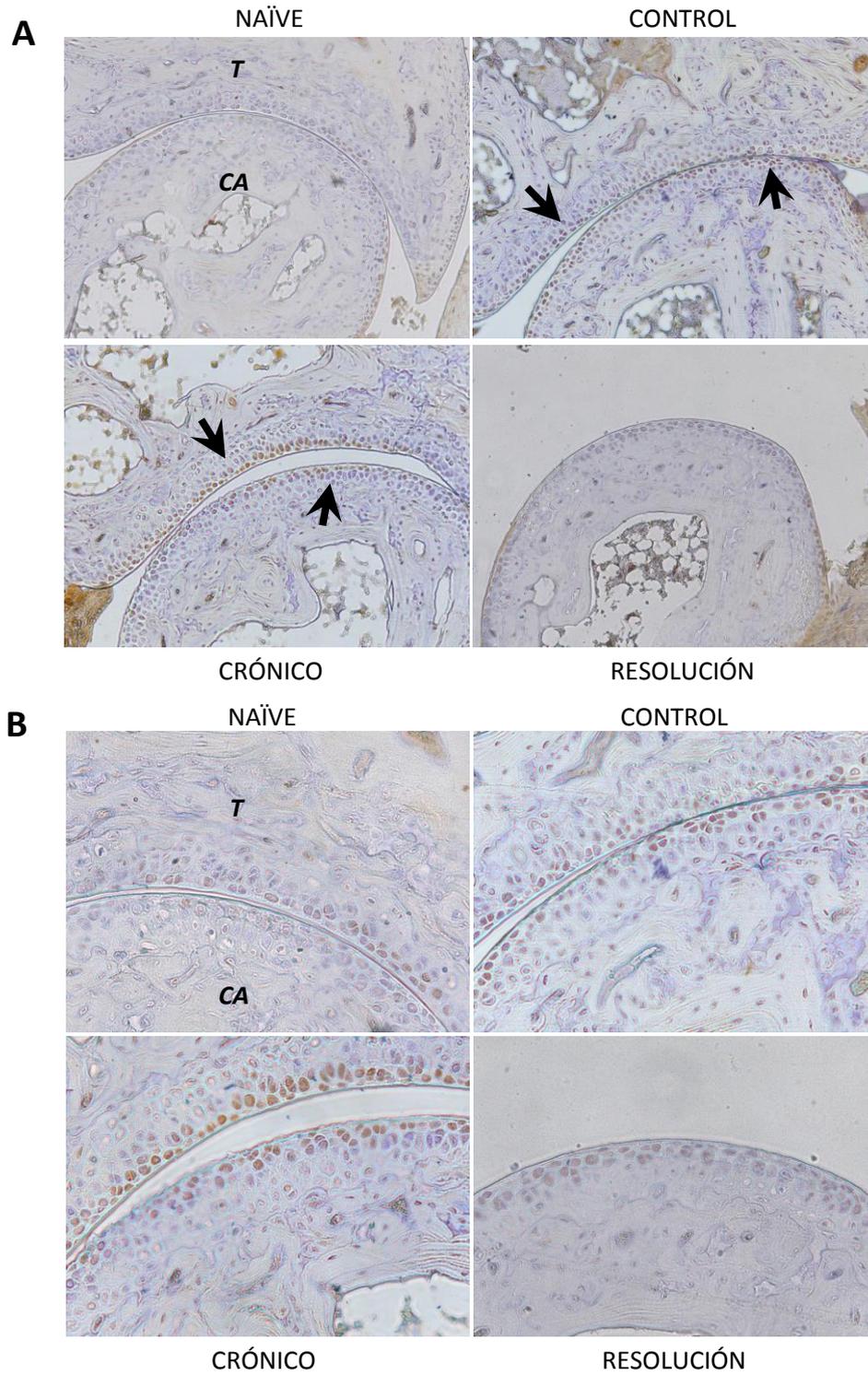


Figura 33. Secciones tisulares frontales de tobillo teñidas por inmunohistoquímica. Marcada la expresión de HO-1 en los condrocitos del cartílago. CA= calcáneo, T= tibia. A: vista 100x, B: vista 200x

En resumen, con este estudio se ha llevado a cabo la adaptación del modelo de artritis por transferencia de suero K/BxN como un ensayo crónico, consiguiendo unos niveles estables de artritis con el tiempo. Aunque los mediadores inflamatorios medidos tienen una mayor participación en la fase aguda del proceso artrítico, en comparación con la fase crónica, en esta fase, las citocinas TNF α , IL-1 β y CXCL-1 podrían contribuir al mantenimiento del proceso crónico. De la misma manera, el estudio histológico de la articulación del tobillo confirma que los niveles máximos de infiltrado celular y exudado sinovial aparecen en la fase aguda de la artritis, y en menor medida, la migración leucocitaria y la depleción de proteoglicano siguen activas en la fase crónica del proceso. No obstante, la cronificación del modelo da lugar a la formación de osteofitos. Además, como muestra el estudio inmunohistoquímico, la expresión de HO-1 sigue activa durante la fase crónica del proceso. Los resultados obtenidos en el ensayo del estrés oxidativo sugieren un posible efecto antiinflamatorio de especies reactivas del oxígeno, al participar en la fase de resolución del proceso artrítico.

4.2 ESTUDIO DE LA DEFICIENCIA DE HO-1 EN LA ARTRITIS EXPERIMENTAL

Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación demostraron que la deficiencia del factor de transcripción Nrf2 en ratones, aumenta la incidencia del proceso artrítico, la respuesta inflamatoria y el daño articular mediante el incremento de distintos mediadores inflamatorios y la sobreexpresión de enzimas proinflamatorias, como COX-2 e iNOS. En ratones artríticos Nrf2^{-/-}, se observó una disminución de la expresión proteica de HO-1 a nivel articular que contribuyó al aumento de la severidad del proceso artrítico en este modelo experimental (Maicas et al. 2011).

Siguiendo esta línea de investigación, se desarrolló un modelo artrítico en ratones *Knockout* (KO) para HO-1, con el objetivo de ver la contribución de la ausencia de HO-1 en los efectos observados en ratones Nrf2^{-/-} ya que HO-1, es una de las enzimas reguladas por este factor de transcripción. HO-1 sería una diana terapéutica más asequible para el tratamiento y prevención de la AR, ya que la actuación directa sobre una enzima no implica tantas variables como actuar sobre un factor de transcripción.

4.2.1 ARTRITIS POR TRANSFERENCIA DE SUERO K/BXN EN RATONES HO-1^{-/-}, HO-1^{+/-} Y HO-1^{+/+}

En el estudio de la influencia de HO-1 sobre el proceso artrítico, utilizamos como modelo experimental de artritis el modelo por transferencia de suero K/BxN original, con una duración de 10 días. Como parte del estudio decidimos incluir no solo a los ratones *KO* o HO-1^{-/-}, sino también a los heterocigóticos o HO-1^{+/-}, ya que consideramos oportuno observar los efectos producidos en este grupo de ratones. Por tanto contábamos en total, con 6 grupos de animales; los ratones *wild type* o HO-1^{+/+}, que nos sirven de grupo control y los ratones modificados genéticamente: HO-1^{+/-} y HO-1^{-/-} y de cada uno de ellos tendríamos animales sanos o naïve y animales artríticos.

4.2.1.1 Incidencia, variación de peso y puntuación macroscópica tras inducir la artritis

Tras desarrollar el proceso artrítico en los 3 grupos experimentales de ratones (HO-1^{-/-}, HO-1^{+/-} y HO-1^{+/+}) según el protocolo anteriormente descrito, (ver Material y métodos apartado 3.1.2.3) se evaluó la **incidencia** y la severidad de la artritis en las patas traseras y delanteras de los ratones. Para ello, se valoró tanto la inflamación producida en los tobillos, como en los dedos y las muñecas, además de la deformación de las articulaciones.

A día 3 del experimento, el 100% de los ratones HO-1^{-/-} y el 90% de los ratones HO-1^{+/-} desarrollaron el proceso artrítico en alguna de sus extremidades, mientras que los ratones control (HO-1^{+/+}) necesitaron 4 días más (día 7) para llegar a estos valores de incidencia (Figura 34). Es decir, los ratones con deficiencia genética de HO-1, empezaron a presentar síntomas artríticos antes que el grupo control, llegando a afectar a todos los individuos del grupo el día posterior a la segunda inmunización, en el caso de los homocigóticos y dos días después en el caso de los heterocigóticos.

Complementariamente se analizaron las variaciones en el **peso** de los ratones ya que desde un primer momento, fue llamativa la diferencia de peso en el grupo de los ratones HO-1^{-/-} con respecto al resto de grupos. La inducción de la artritis, siempre conlleva una ligera pérdida de la masa corporal, no obstante, la pérdida de peso observada en los ratones HO-1^{-/-} se debe probablemente a las alteraciones que la

4. Resultados

4.2 Estudio de la deficiencia de HO-1 en la artritis experimental

deficiencia de esta enzima provoca en el organismo del animal. Estas anomalías se mencionan en la Introducción en el apartado 1.4.4 y son un ejemplo de los muchos sistemas en los que participa HO-1. Antes de inducir la artritis, la diferencia de peso entre los ratones HO-1^{-/-} y el resto ya era llamativa, pero durante el desarrollo de la artritis, esta diferencia se incrementa mostrando un pico en los días 4, 5 y 6. Además los ratones HO-1^{+/-} también van perdiendo progresivamente peso llegando a verse diferencias significativas con respecto al grupo control HO-1^{+/+} en los últimos días de la enfermedad (figura 34).

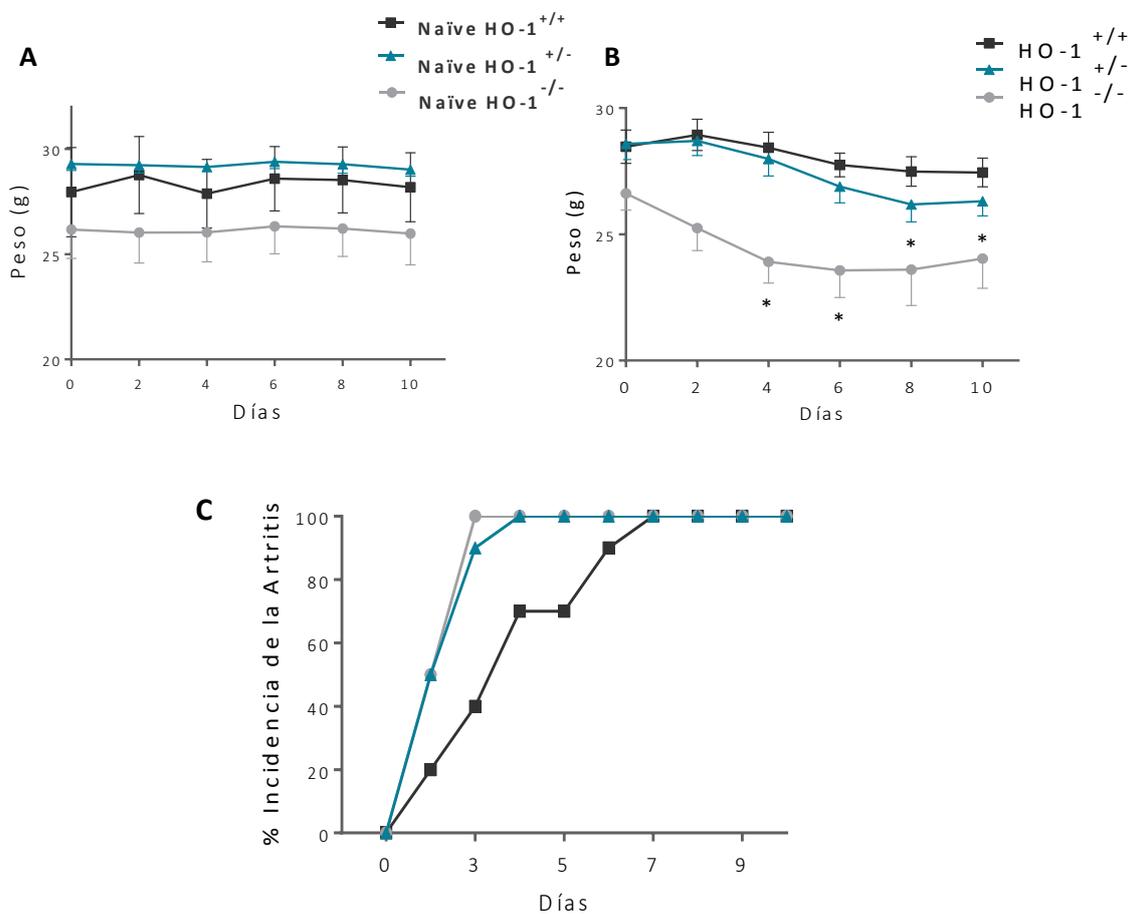


Figura 34. Peso de los ratones naïve (A) y artríticos (B) e incidencia de la artritis (C). Tras desarrollar el proceso artrítico, mediante la administración de suero procedente de ratones espontáneamente artríticos a días 0 y 2, se analizó la velocidad con la que los ratones de cada grupo desarrollaban el proceso artrítico y la pérdida de peso ocasionada por la enfermedad. Valores analizados como media \pm S.E.M, $n=10$. * $P<0,05$ en comparación con los animales artríticos control wild type, ANOVA (2 vías) seguido del test de Tukey.

Podría pensarse erróneamente, que al administrar la misma dosis de suero K/BxN inmunizado con los anticuerpos anti GPI a todos los ratones, aquellos con menos peso poseen una mayor concentración de anticuerpos en su organismo y por tanto son más susceptibles a desarrollar la artritis; sin embargo, la probabilidad de sufrir la enfermedad, no está relacionada con la concentración de anticuerpos, sino más bien, con la susceptibilidad genética e inmunológica de cada individuo. De hecho, las dosis óptimas inmunogénicas dependen de cada antígeno, pero en general dosis muy altas pueden inhibir la respuesta inmune, sobre todo porque inducen un estado específico de no respuesta en las células T y a veces en las células B (Paul, 2013).

Como se observa en la figura 35, la **valoración macroscópica** de la artritis en ambas patas (traseras y delanteras), mostró diferencias notables en cuanto a la gravedad de la enfermedad desarrollada en los distintos grupos. En contra de lo que cabría esperar, el grupo que mostraba un proceso artrítico más severo era el correspondiente a los ratones HO-1^{+/-}. La artritis padecida en este grupo produjo síntomas de edema y deformación en las patas de los animales muy llamativos, mostrando diferencias significativas con respecto al grupo control, visibles desde los primeros días del proceso artrítico.

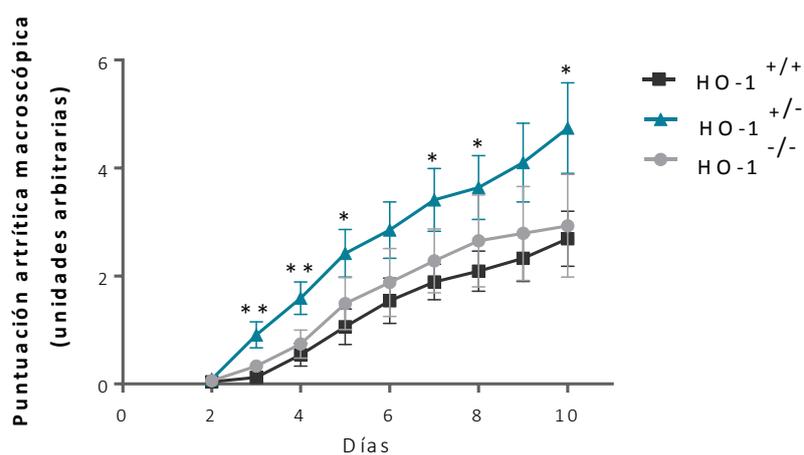


Figura 35. Puntuación macroscópica. La puntuación macroscópica se llevó a cabo visualmente utilizando una escala de 0-2 para cada pata. Puntuación máxima por ratón: 8. Valores representados como media \pm S.E.M. n=10. *P<0,05 en comparación con los animales artríticos wild-type del grupo control. ANOVA (dos vías) seguido del test de Tukey.

4. Resultados

4.2 Estudio de la deficiencia de HO-1 en la artritis experimental

Por otro lado el grupo HO-1^{-/-} también sufrió un proceso inflamatorio superior al del grupo HO-1^{+/+} aunque sus diferencias no fueron tan significativas como las observadas entre el grupo control y el heterocigótico.

Recordemos que este modelo experimental de artritis se caracterizaba por producir un proceso inflamatorio muy llamativo en las extremidades de los animales (superior al observado en otros modelos), principalmente localizado en el tobillo.

Al evaluar la gravedad en la artritis de las patas delanteras y traseras por separado, se observó que en las **patas traseras**, las diferencias entre los ratones que no expresan HO-1 y los ratones del grupo control son mucho mayores, siendo el grupo HO-1^{-/-} el que muestra un empeoramiento de la enfermedad muy superior al del grupo control (Figura 36). En cuanto a las **patas delanteras**, los ratones muestran valores elevados en la puntuación artrítica, en todos los grupos, pero no se aprecian diferencias significativas entre los grupos experimentales.

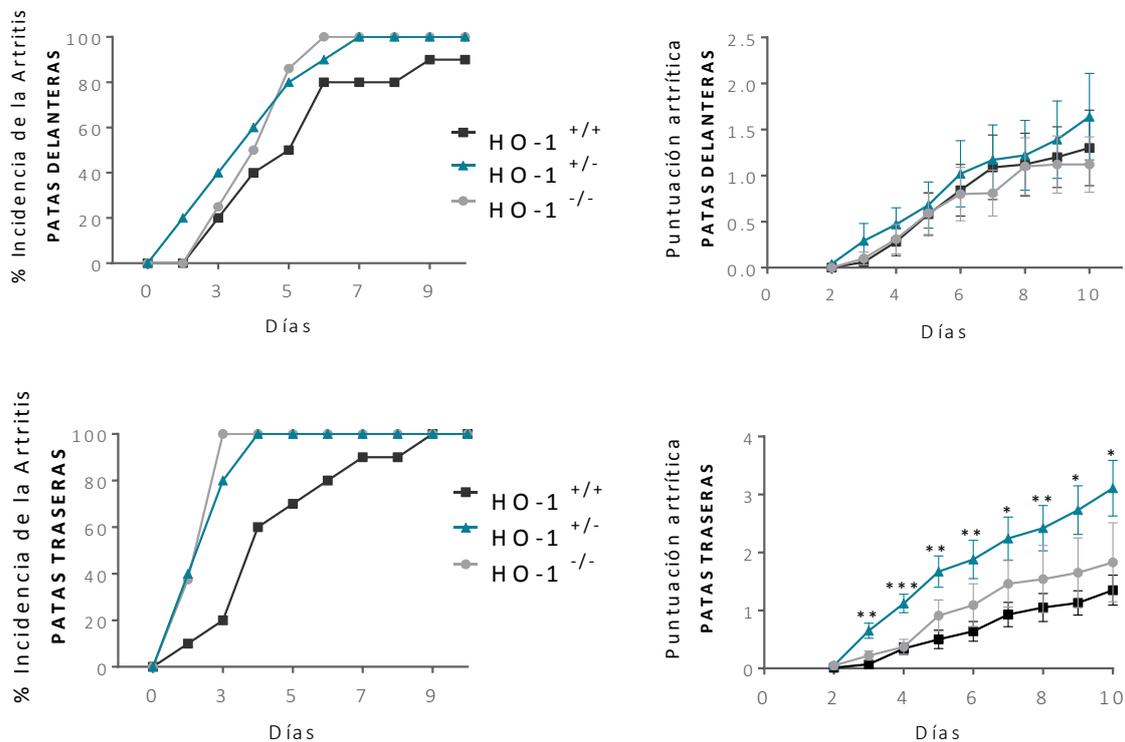


Figura 36. Incidencia y Puntuación macroscópica en patas delanteras y traseras por separado. La puntuación macroscópica se llevó a cabo visualmente utilizando una escala de 0-2 para cada pata. Puntuación máxima por ratón: 4. Valores representados como media \pm S.E.M. $n=10$. * $P<0,05$ en comparación con los animales artríticos wild-type del grupo control. ANOVA (dos vías) y test de Tukey.

En la valoración de la incidencia sucede lo mismo, las diferencias entre los grupos deficientes en HO-1 y el control son mucho más llamativas en las patas traseras que en las delanteras. Debido a que estas diferencias entre los distintos grupos de ratones son más acusadas en las patas traseras, los estudios y análisis posteriores, se centrarán principalmente en esta articulación.

En las imágenes siguientes (Figura 37), realizadas a día 10 desde la inducción de la artritis, se puede comparar el grado de inflamación de patas delanteras y traseras de los tres grupos en estudio. Destaca la inflamación de las patas traseras del grupo HO-1^{+/-}. Además cabe recalcar que en los ratones HO-1^{+/+} la inflamación se localiza principalmente en los dedos, tanto en pata trasera como en delantera, mientras que en los HO-1^{-/-}, la inflamación afecta mayoritariamente a la muñeca (en el caso de la pata delantera) y al tobillo (en el caso de pata trasera).

4. Resultados

4.2 Estudio de la deficiencia de HO-1 en la artritis experimental

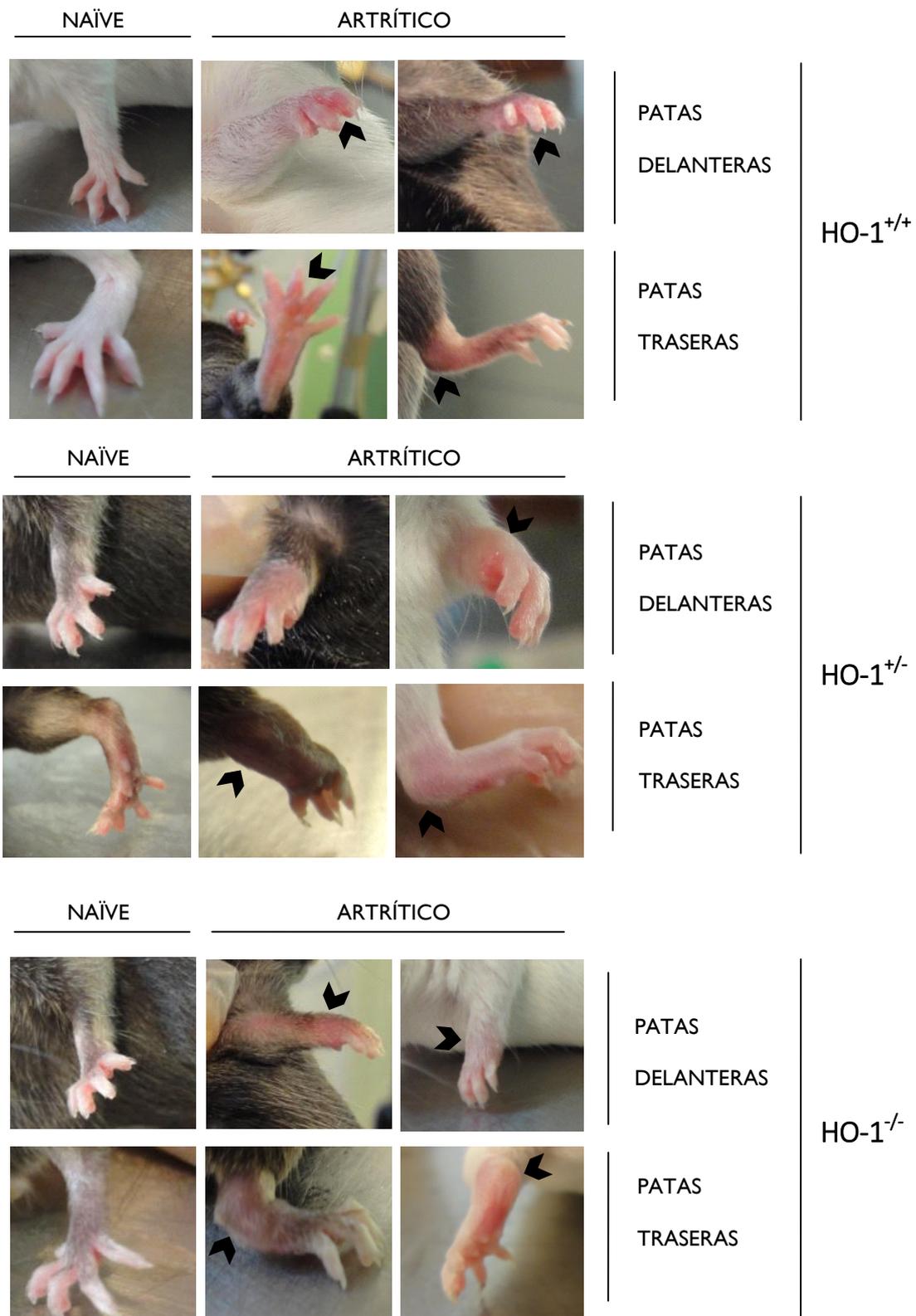


Figura 37. Fotografías de las patas delanteras y traseras de los ratones sanos y artríticos de los 3 grupos en estudio. Las fotografías se realizaron a día 10 del proceso artrítico.

4.2.1.2 Parámetros analizados en sangre

A día 9 del experimento, se extrajo sangre de los ratones para analizar la población de células sanguíneas: glóbulos blancos (linfocitos, monocitos, y granulocitos), recuento de plaquetas (plaquetas existentes en un milímetro cúbico de sangre), volumen medio plaquetario, hematocrito (porcentaje del volumen total de la sangre, compuesta por glóbulos rojos) y los valores de hemoglobina.

En la figura 38, observamos como en todos los casos, los ratones artríticos KO en HO-1 mostraban niveles significativamente elevados de las **células blancas** en comparación al grupo control y al grupo heterocigótico.

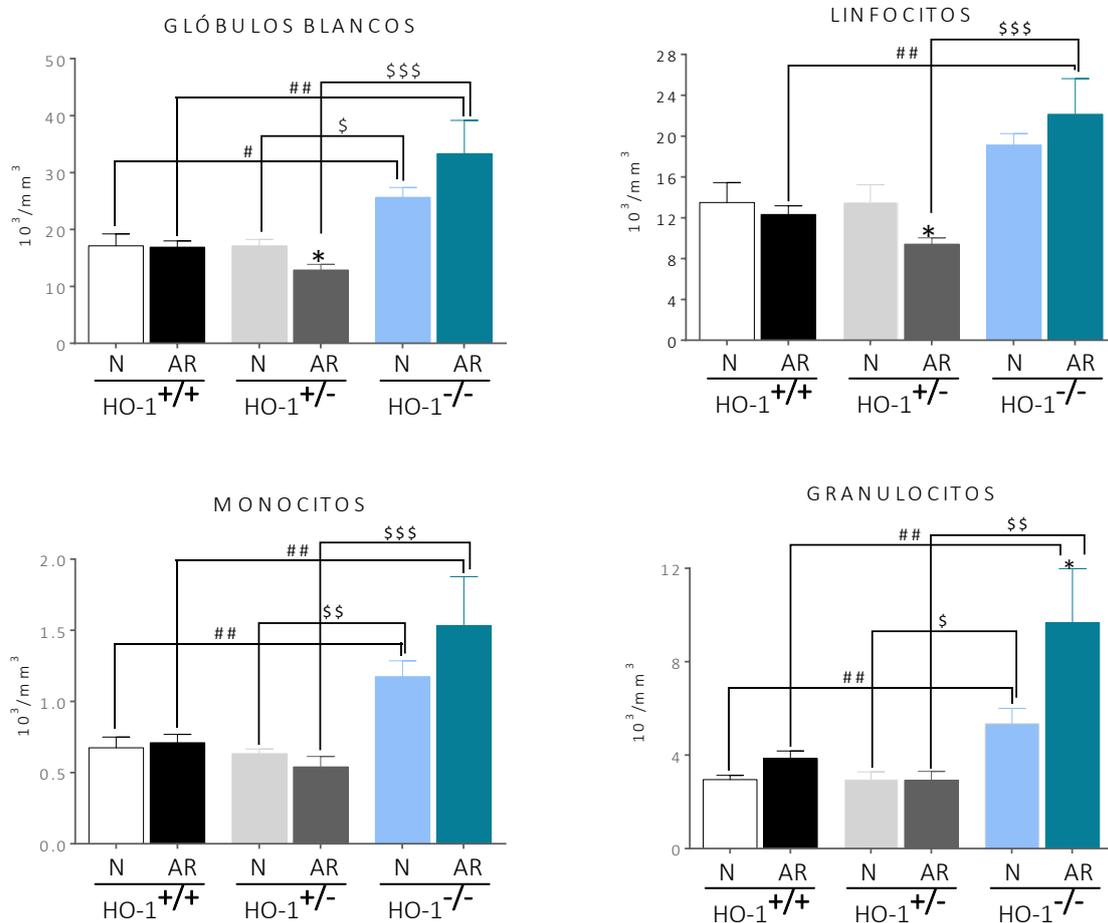


Figura 38. Parámetros analizados en sangre fresca. Concentración de glóbulos blancos, monocitos, linfocitos y granulocitos, datos representados como media \pm S.E.M. N (naïve), n=4; AR (artrítico) n=10. *P<0,05; comparando cada grupo artrítico con su respectivo naïve mediante ANOVA de una vía seguido del test de Sidak. #P<0,05; ##P<0,01 comparado respecto al grupo control HO-1^{+/+} y \$P<0,05; \$\$P<0,01; \$\$\$P<0,001 comparando grupo HO-1^{+/-} y HO-1^{-/-} mediante ANOVA de una vía y test de Tukey.

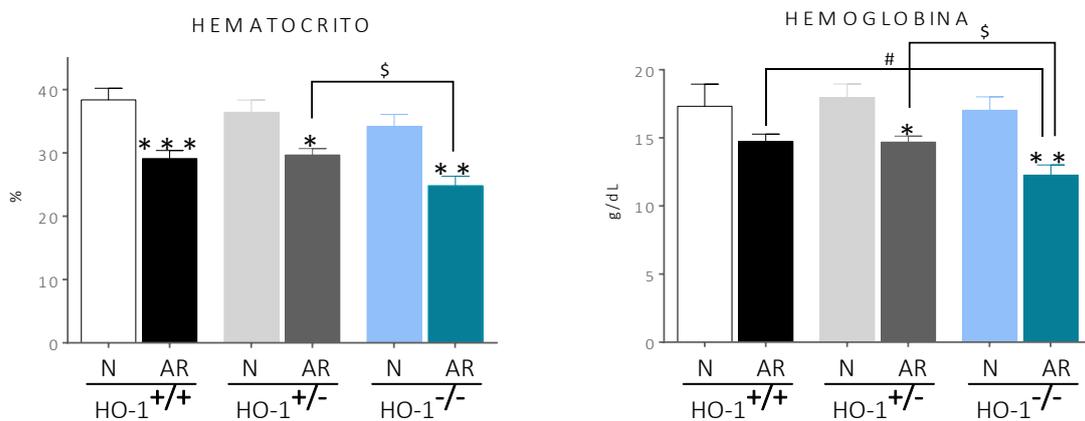
4. Resultados

4.2 Estudio de la deficiencia de HO-1 en la artritis experimental

Además, hay que señalar que estas diferencias se vieron también al comparar los animales sanos HO-1^{-/-} con los naïve HO-1^{+/+} y los animales sanos HO-1^{+/-}.

Por otra lado, los ratones HO-1^{+/-} no mostraron cambios con respecto al grupo control, únicamente se observó un descenso de la población de los linfocitos en sangre, al producirse la artritis.

Los niveles de **hematocrito** representan el porcentaje de eritrocitos que hay en la sangre. Este valor está relacionado con los niveles de **hemoglobina**, ya que ésta es transportada por los eritrocitos. Ambos parámetros disminuyen cuando existe un descenso de la producción de eritrocitos por parte de la médula ósea, cuando aumenta la destrucción de los mismos o cuando existe un sangrado. Una disminución del recuento de hematíes, del hematocrito y de la hemoglobina puede conducir a una anemia, proceso muy común en los pacientes que padecen AR (Dayer y Choy 2010).



*Figura 39. Hematocrito y hemoglobina analizados en sangre fresca a día 10. Valores representados como media \pm S.E.M. N (naïve), n=4; AR (artrítico) n=10. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 comparando cada grupo artrítico con su respectivo naïve. Análisis ANOVA de una vía seguido del test de Sidak. §P<0,05 para comparar el grupo HO-1^{+/-} con el grupo HO-1^{-/-} y #P<0,05 comparando respecto al grupo control HO-1^{+/+} analizado mediante ANOVA de una vía y test de Tukey.*

Al provocarse el proceso artrítico vemos como en todos los grupos se produce una disminución del hematocrito y de la hemoglobina en sangre. Además en el grupo HO-1^{-/-} artrítico, el descenso en los valores de hemoglobina y hematocrito es muy significativo si lo comparamos respecto a los grupos control y heterocigótico.

Los parámetros analizados relativos a las plaquetas son la concentración de **plaquetas** por mm^3 de sangre y el **volumen medio plaquetario** que hace referencia al tamaño promedio de las plaquetas.

El aumento en la concentración de plaquetas tras un proceso inflamatorio o infeccioso es habitual, pero cabe destacar que el aumento producido en los grupos alterados genéticamente es muy llamativo, viéndose diferencias significativas entre el grupo HO-1^{-/-} y el control. Por otro lado, el volumen de las plaquetas puede verse alterado en ciertas circunstancias, generalmente a medida que envejecen, las plaquetas van haciendo más pequeñas. En este caso observamos un aumento en el volumen medio plaquetario de los ratones KO artríticos con respecto a los controles y a los ratones HO-1^{+/-} (Figura 40).

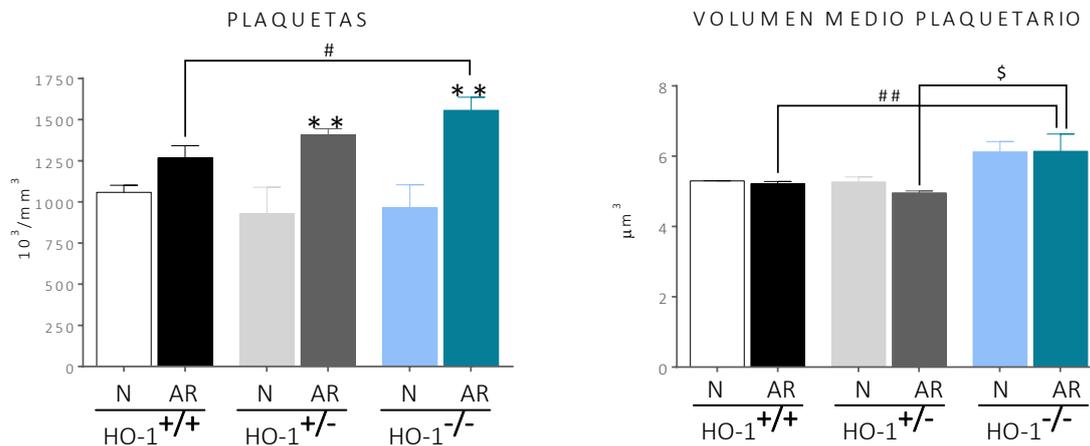


Figura 40. Concentración de plaquetas en sangre fresca y volumen plaquetario medio. Valores representados como media \pm S.E.M. N (naïve), n=4; AR (artrítico) n=10. **P<0,01; comparando cada grupo artrítico con su respectivo naïve. Análisis ANOVA de una vía seguido del test de Sidak. #P<0,05; ##P<0,01 comparando respecto al grupo control HO-1^{+/+} y §P<0,05 para comparar el grupo HO-1^{+/-} con el grupo HO-1^{-/-} analizado mediante ANOVA de una vía y test de Tukey.

De estos análisis podemos deducir que los ratones HO-1^{-/-} poseen mayor número de glóbulos blancos que los ratones control y estas diferencias se incrementan tras la inducción del proceso artrítico. También se observan alteraciones importantes en cuanto a la concentración de hemoglobina y los parámetros que afectan a las plaquetas entre los ratones control y los HO-1^{-/-} artríticos. Esto nos da una idea de la importancia que posee esta enzima en el sistema inmunológico y de cómo la inducción de un

proceso inflamatorio autoinmune produce un desajuste de las poblaciones celulares sanguíneas mucho más acusado en los ratones que no expresan HO-1.

4.2.1.3 Niveles de citocinas y mediadores inflamatorios en suero

A tiempo final del modelo artrítico extrajimos sangre de los animales de los distintos grupos. De esta sangre extraída a día 10 del proceso inflamatorio obtuvimos el suero mediante centrifugación. En este suero analizamos distintos mediadores inflamatorios para obtener información de su concentración sérica a tiempo final del modelo artrítico.

Como se muestra en la figura 41, los niveles de una serie de mediadores inflamatorios medidos en este suero se vieron alterados en los animales HO-1 deficientes. Los ratones artríticos alterados genéticamente para inhibir completamente la expresión de HO-1, mostraron mayores niveles de las proteínas analizadas, que están implicadas principalmente en la migración celular, como son: la **ICAM-1**, la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (**MCP-1**), la **E-Selectina**, el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (**PAI-1**) y la **MMP-9** con respecto a los animales HO-1^{+/+} o HO-1^{+/-}. En todos estos mediadores proinflamatorios se observaron diferencias muy significativas entre el grupo HO-1^{-/-} y HO-1^{+/+}, pero además en el caso de ICAM-1 y MCP-1 también se aprecian variaciones importantes del grupo HO-1^{-/-} con respecto a los ratones HO-1^{+/-}.

ICAM-1 (también conocido como CD54) es una proteína transmembrana asociada a leucocitos muy conocida por su importancia en estabilizar la interacción entre células y facilitar la transmigración endotelial leucocitaria. Dado los altos niveles de glóbulos blancos que observamos en sangre de los ratones HO-1^{-/-} (Figura 41), es razonable que esta proteína esté más elevada en este grupo.

Del mismo modo, **MCP-1** (o CCL2) que induce la liberación de los monocitos al torrente sanguíneo y la entrada en el tejido circundante para convertirse en macrófagos tisulares, también está muy elevada en este grupo HO-1^{-/-}, como cabría esperar según lo observado en la figura 41. Hay que destacar que los ratones HO-1^{-/-} naïve presentaban niveles de este mediador superiores a los observados en los ratones sanos control, y al inducir el proceso artrítico, sus niveles se incrementaron llamativamente, generando importantes diferencias con el resto de grupos artríticos.

Por otro lado, E-selectina (o CD62E), también ejerce un papel crucial en los eventos de adhesión celular y cómo podemos ver en la figura 41, sus valores sólo se incrementan en el grupo KO tras inducir la artritis, lo que provoca que se observen diferencias significativas entre los niveles de este grupo y el grupo control.

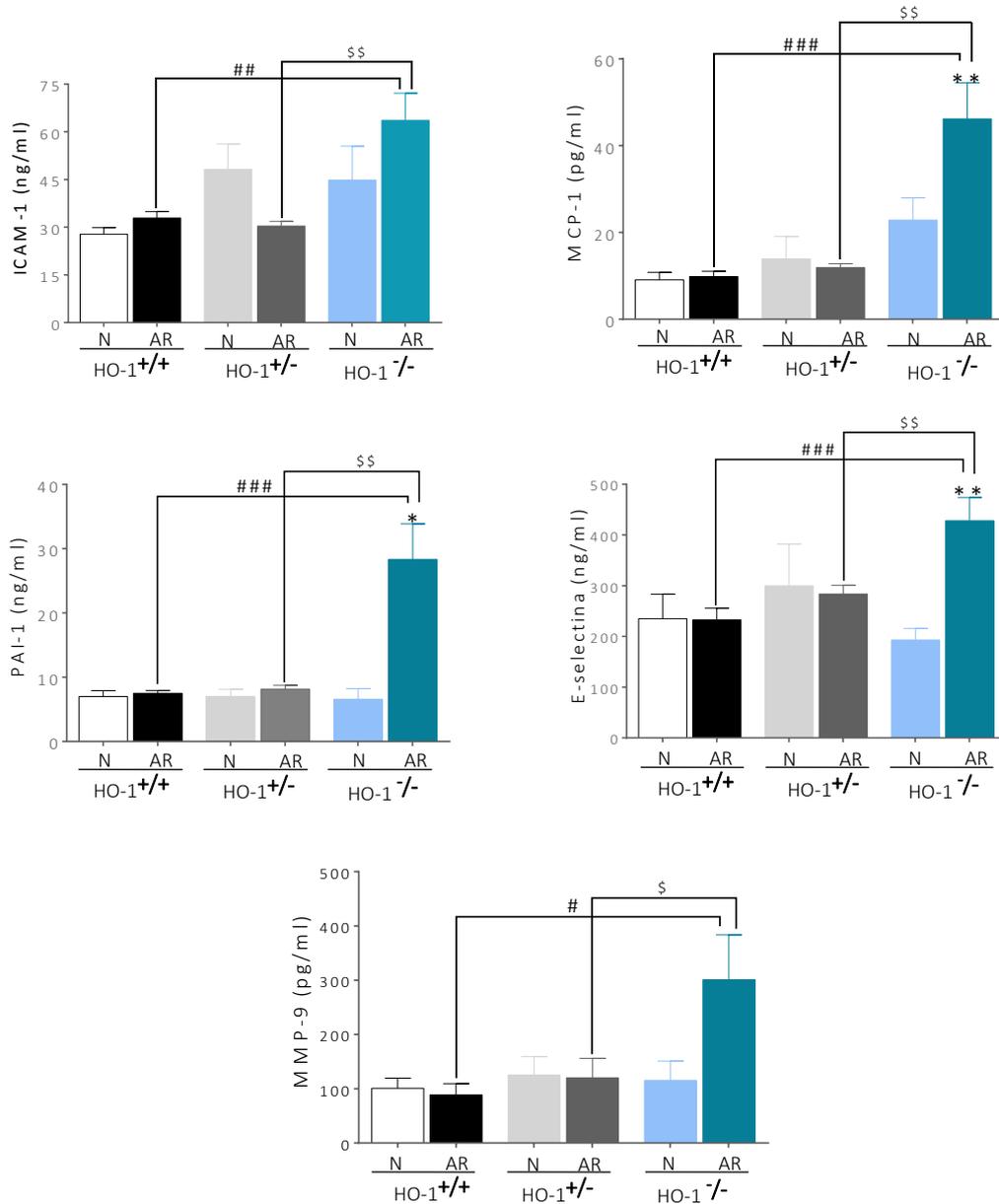


Figura 41. Niveles de mediadores inflamatorios analizados en suero de los ratones a día 10 desde la inducción del proceso artrítico. Datos representados como media \pm S.E.M. N (naïve), n=4; AR (artrítico) n=10. *P<0,05; **P<0,01 comparando cada grupo artrítico con su respectivo naïve. Análisis ANOVA de una vía seguido del test de Sidak. #P<0,05; ##P<0,01; ###P<0,001 comparando respecto al grupo control HO-1^{+/+} y \$P<0,05; \$\$P<0,01 para comparar el grupo HO-1^{+/-} con el grupo HO-1^{-/-}, &P<0,05 para comparar los grupos naïve respecto al grupo naïve HO-1^{+/+} analizado mediante ANOVA de una vía y test de Tukey.

PAI-1 es una proteína que inhibe la fibrinólisis facilitando la formación de coágulos. En este caso está muy relacionada con los niveles elevados de plaquetas que observamos en el grupo *KO* (ver Resultados apartado 4.2.1.2). En la figura 41, podemos observar que la concentración sérica de esta proteína presenta valores muy elevados en los ratones *KO* tras inducir la artritis si los comparamos con el resto de grupos.

La **MMP-9**, participa en la degradación de la matriz extracelular en los procesos fisiológicos normales, como la angiogénesis, la cicatrización de heridas o la migración celular, y además suele estar elevada en pacientes con AR (Gruber et al. 1996). Como en todos los casos anteriores, los niveles en suero de esta proteína se elevan de forma muy llamativa en el grupo *KO* tras inducir la artritis

Por otro lado, los niveles de **VEGF**, **IL-1 β** , **IFN- γ** , e **IL-10** después de la inducción de la artritis fueron menores en los animales *HO-1^{-/-}* con respecto a los ratones *HO-1^{+/+}*; además en el caso de la **IL-1 β** y el **IFN- γ** también se produjeron diferencias significativas con respecto al grupo *HO-1^{+/-}* (Figura 42).

VEGF, es una proteína implicada en la angiogénesis, un proceso muy característico de la artritis reumatoide. Sin embargo, los ratones *KO* parecen tener este proceso disminuido si lo comparamos con los ratones artríticos control.

Por otra parte, el **IFN- γ** cuya función más importante es la activación de los macrófagos, posee además funciones reguladoras que le han atribuido ciertas propiedades antiinflamatorias al igual que a la **IL-10**. Como podemos observar en la figura 42, los niveles de esta citocina en los ratones *KO naïve*, parten desde valores muy inferiores a los observados en los ratones sanos control. Al inducir la artritis en los ratones *HO-1^{-/-}*, estos niveles de **IFN- γ** permanecen prácticamente inalterados produciendo diferencias muy significativas con los valores de este mediador obtenidos en los grupos artríticos control y *HO-1^{+/-}*. Por otro lado, los ratones *HO-1^{+/-}*, siguen la misma tendencia que los ratones control.

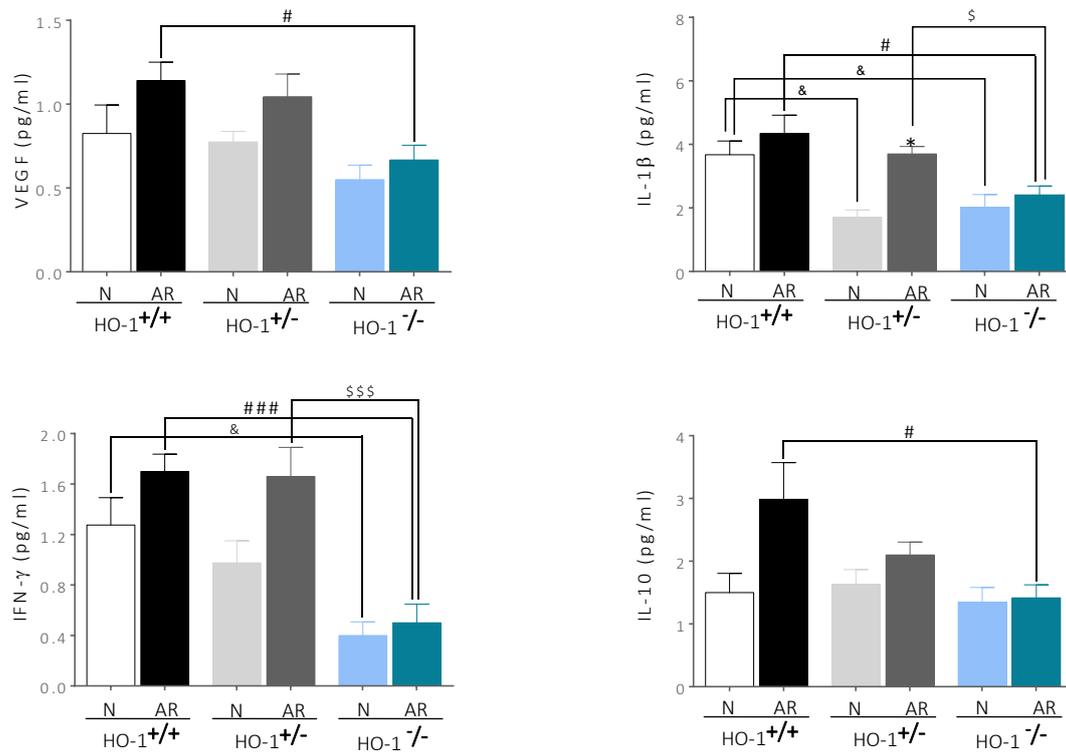


Figura 42. Niveles de mediadores analizados en suero de los ratones a día 10 desde la inducción del proceso artrítico. Datos representados como media \pm S.E.M. N (naïve), n=4; AR (artrítico) n=10. *P<0,05; comparando cada grupo artrítico con su respectivo naïve. Análisis ANOVA de una vía seguido del test de Sidak. #P<0,05; ###P<0,001; comparando respecto al grupo control HO-1^{+/+} y §P<0,05; §§§P<0,001 para comparar el grupo HO-1^{+/-} con el grupo HO-1^{-/-}, &P<0,05 para comparar los grupos naïve respecto al grupo naïve HO-1^{+/+} analizado mediante ANOVA de una vía y test de Tukey.

En el caso de la IL-1 β , una de las citocinas más importantes en la respuesta inflamatoria, cabe destacar que a día 10 del proceso artrítico, el grupo HO-1^{+/-} es el que presenta diferencias más significativas entre los ratones sanos y los artríticos. Sus niveles en los animales sanos HO-1^{+/-} y HO-1^{-/-} son menores que los que presentan los animales sanos control (Figura 42). Sin embargo, los ratones HO-1^{-/-} artríticos presentan una concentración sérica más baja de IL-1 β que el resto de grupos a este tiempo de estudio (día 10), aunque es probable, que al ser una enzima de actuación muy temprana, sus niveles fueran mayores a tiempos más cortos.

En el caso de los niveles de IL-6 y los factores de crecimiento transformante (TGF) β_1 y TGF- β_2 las diferencias más significativas la vemos únicamente entre los animales sanos y

4. Resultados

4.2 Estudio de la deficiencia de HO-1 en la artritis experimental

artríticos del grupo HO-1^{+/-} (Figura 43). La IL-6 es una interleucina muy implicada en la artritis en humanos, que interviene en la producción de inmunoglobulinas, en la diferenciación de linfocitos B, la activación de los linfocitos T citotóxicos y células plasmáticas así como en la modulación de la hematopoyesis, y es la responsable, junto con la IL-1 β , de la síntesis de proteínas de fase aguda hepática, en especial fibrinógeno.

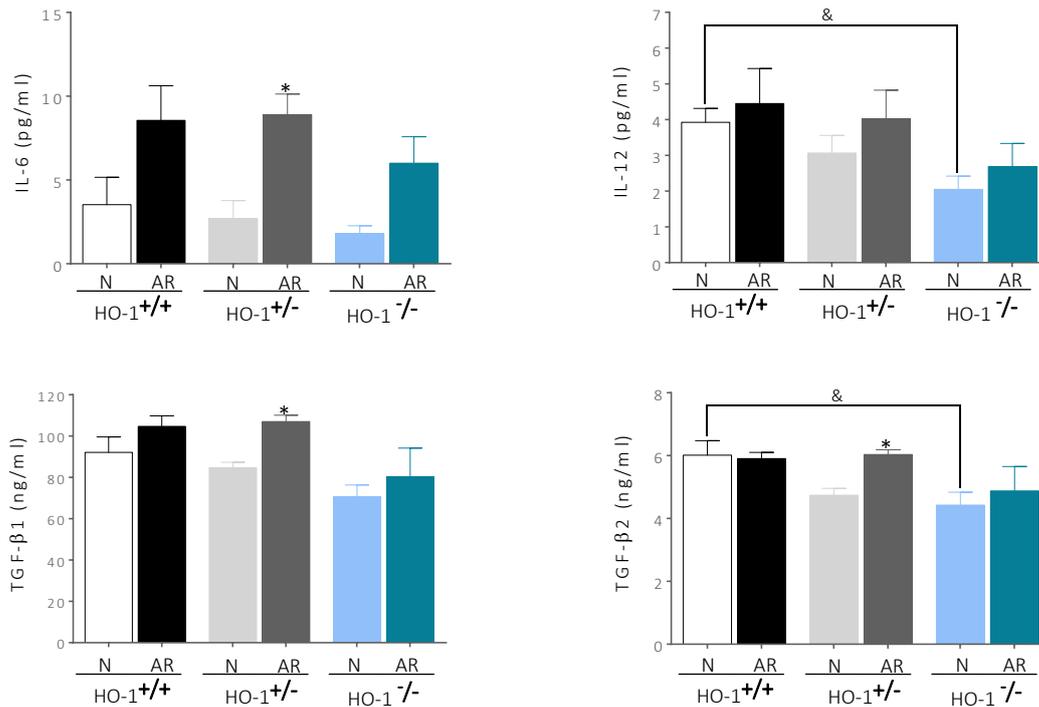


Figura 43. Niveles de mediadores inflamatorios analizados en suero de los ratones a día 10 desde la inducción del proceso artrítico. Datos representados como media \pm S.E.M. N (naïve), $n=4$; AR (artrítico) $n=10$. * $P<0,05$; comparando cada grupo artrítico con su respectivo naïve. Análisis ANOVA de una vía seguido del test de Sidak. & $P<0,05$; para comparar los grupos naïve respecto al grupo naïve HO-1^{+/+} analizado mediante ANOVA de una vía y test de Tukey.

TGF- β son proteínas de secreción que llevan a cabo diversas funciones en la célula, como el control del crecimiento celular, proliferación celular, procesos de diferenciación y apoptosis. Los valores de TGF- β 2, e IL-12 en los ratones sanos HO-1^{-/-} son significativamente más bajos que los del grupo naïve HO-1^{+/+}, es decir, que siendo ratones sanos, parten de niveles menores de estas citocinas (Figura 43). Entre las funciones de la IL-12 destacaría su participación en la activación de las células Th1 y en la estimulación de la producción y citotoxicidad de las células T citotóxicas y de las células NK (Seder 1995).

Como se muestra en la figura 44, los niveles de la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1), CXCL-1, IL-17 y PGE₂ no mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales en el suero analizado en este punto concreto del experimento, es decir, a día 10, aunque es posible que estos parámetros, al afectar principalmente a fases más tempranas del proceso inflamatorio, se hubiesen visto alteradas en los días iniciales tras inducir la artritis.

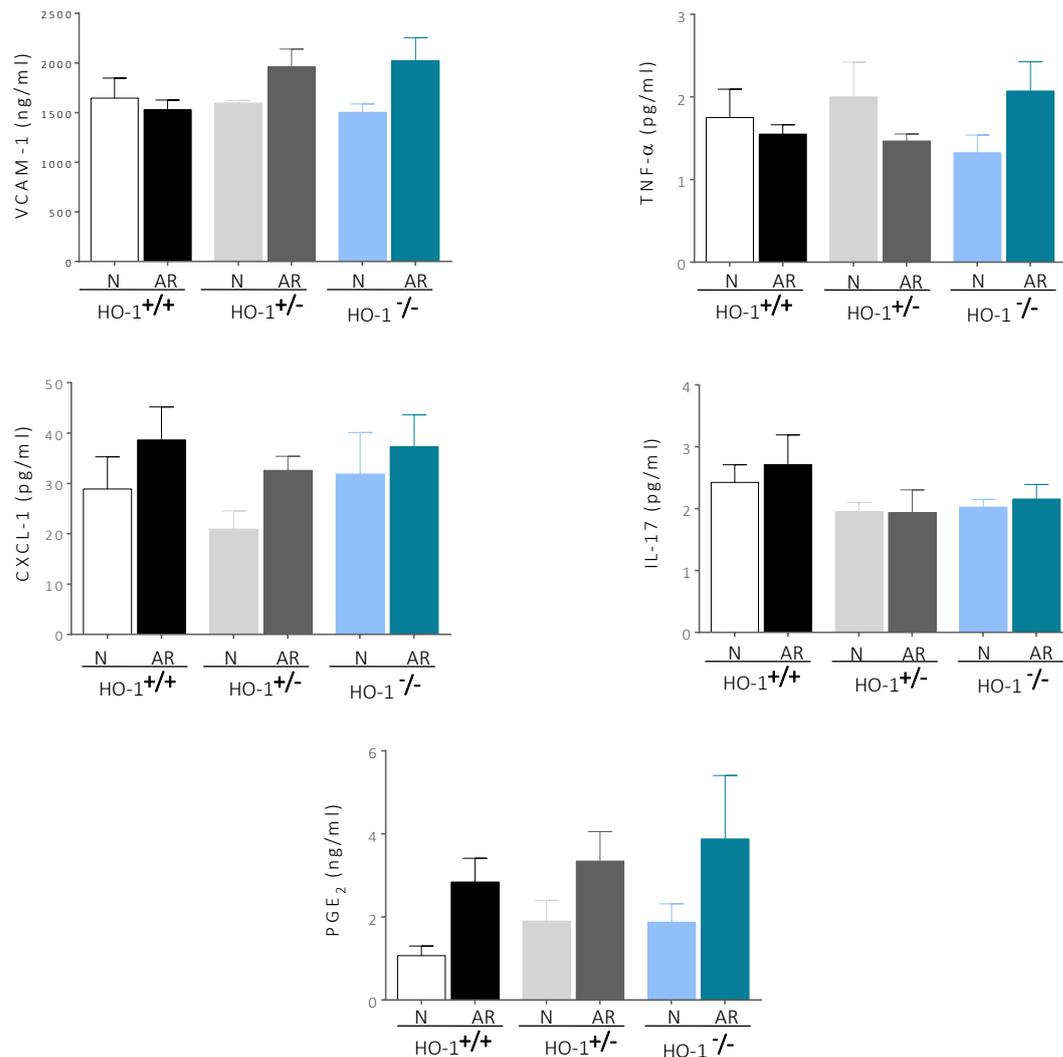


Figura 44. Niveles de mediadores inflamatorios analizados en suero de los ratones a día 10 desde la inducción del proceso artrítico. Datos representados como media \pm S.E.M. N (naïve), n=4; AR (artrítico) n=10. Comparamos cada grupo artrítico con su respectivo naïve mediante análisis ANOVA de una vía seguido del test de Sidak. Además comparamos los grupos artríticos entre ellos y los grupos naïve entre ellos mediante ANOVA de una vía y test de Tukey.

En el caso concreto del $\text{TNF}\alpha$ presenta niveles en suero muy bajos a este tiempo desde la inducción del proceso artrítico (Figura 44).

4.2.1.4 Niveles de mediadores inflamatorios en suero a diferentes tiempos del proceso artrítico

Analizamos los valores de ciertos mediadores inflamatorios importantes en la degeneración del cartílago y del hueso, realizando un seguimiento de su concentración en suero a distintos tiempos durante el desarrollo de la enfermedad. Estos mediadores eran: MMP-3, osteocalcina (OC) y RANKL.

En la figura 45, observamos como los niveles de **MMP-3** van aumentando progresivamente en los 3 grupos produciéndose un pico a día 7 y posteriormente descienden de nuevo. En el grupo $\text{HO-1}^{-/-}$ el aumento es más acusado, siendo a día 7 significativamente superior a los niveles de MMP-3 del grupo $\text{HO-1}^{+/+}$ y $\text{HO-1}^{+/-}$. La enzima MMP-3 degrada el colágeno de tipo II, III, IV, IX, y X, proteoglicanos, fibronectina, laminina, y elastina. Además, la MMP-3 también puede activar otras MMP tales como MMP-1, MMP-7 y MMP-9, por tanto es una proteína crucial en la remodelación del tejido conectivo (Martel-Pelletier et al. 2001).

La **OC** es producida por los osteoblastos durante la formación ósea. En este caso observamos como los animales $\text{HO-1}^{-/-}$ presentan niveles más bajos en comparación al grupo control en los días 4 y 7 del proceso artrítico. En el resto de grupos no se observan diferencias significativas entre los distintos tiempos (Figura 45).

La principal función de **RANKL** es la activación de los osteoclastos, células implicadas en la resorción ósea. A medida que avanza el modelo artrítico, los niveles de RANKL van disminuyendo progresivamente en los grupos deficientes en HO-1 mostrando diferencias respecto al grupo control, hasta llegar al nivel más bajo a día 10. Estos resultados son indicativos de un descenso en la actividad ósea en los ratones $\text{HO-1}^{-/-}$ y $\text{HO-1}^{+/-}$ (Figura 45).

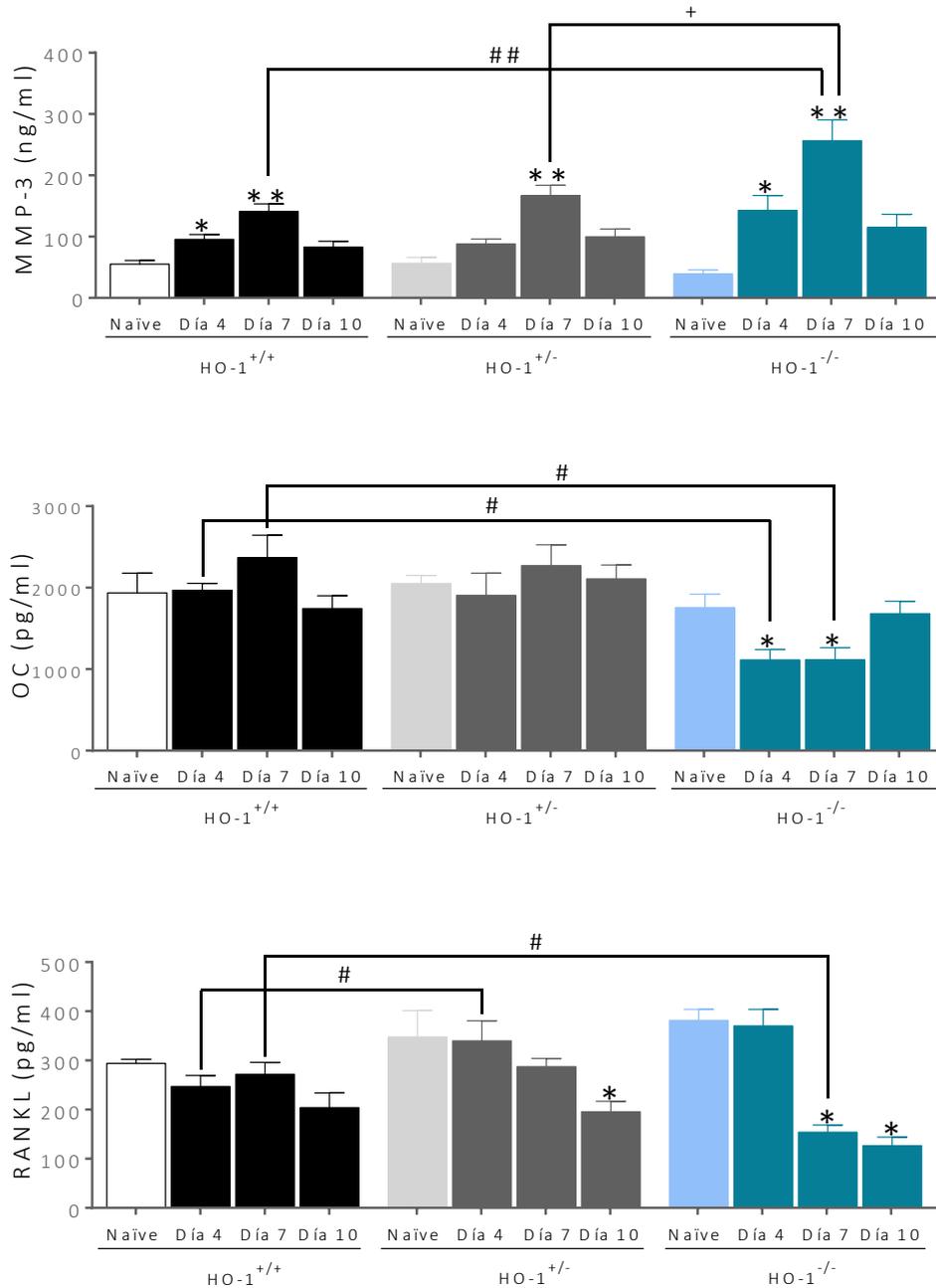


Figura 45. Niveles de mediadores inflamatorios en suero a días 4, 7 y 10 del proceso artrítico. Valores de MMP-3, osteocalcina (OC) y RANKL analizados a distintos tiempos. Datos representados como media \pm S.E.M. Naïve, n=4; artrítico n=10. *P<0,05; **P<0,01 comparando cada grupo artrítico con su respectivo naïve. Análisis de ANOVA (dos vías) seguido del test de Sidak. #P<0,05; ##P<0,01 comparado respecto al grupo control HO-1^{+/+} y ⁺⁺P<0,01 respecto al grupo artrítico HO-1^{+/-}. ANOVA (dos vías) y test de Tukey.

4.2.1.5 Niveles de mediadores inflamatorios en homogeneizado de pata trasera a día 10

Una vez sacrificados los ratones a día 10, se amputaron las patas traseras y delanteras de los animales y se homogeneizaron en nitrógeno líquido con tampón A con inhibidores de proteasas. En este homogeneizado se analizaron los mediadores inflamatorios más característicos de la artritis que pudieran encontrarse a nivel local.

Como se puede observar en la Figura 46, los niveles de **MMP-3** están muy elevados en los grupos artríticos, y además se observan diferencias importantes entre los grupos deficientes en HO-1 y los ratones control. Lo mismo sucede con los niveles de MMP-3 analizados en suero a día 7 (Figura 45). Los niveles de **IL-6** también muestran diferencias significativas entre los ratones HO-1^{-/-} y HO-1^{+/-} en relación al grupo HO-1^{+/+}, a diferencia de lo observado al analizar el suero.

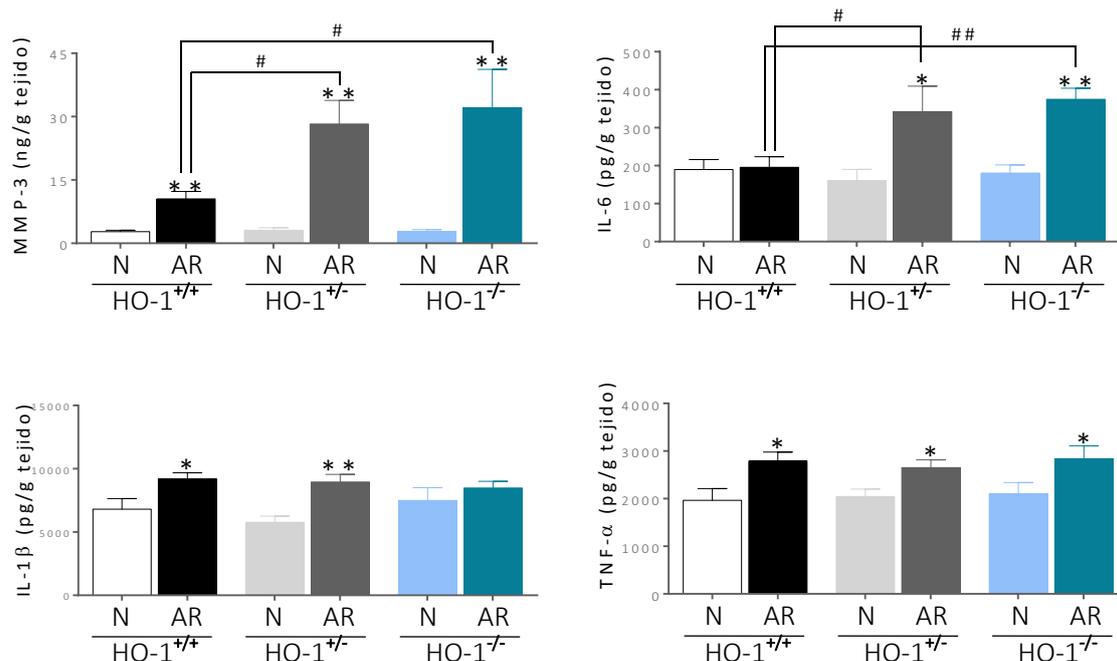


Figura 46. Niveles de mediadores inflamatorios analizados en homogeneizado de las patas a día 10 desde la inducción del proceso artrítico. Datos representados como media \pm S.E.M. N (naïve), n=4; AR (artrítico) n=10. *P<0,05; **P<0,01 comparando cada grupo artrítico con su respectivo naïve mediante análisis de ANOVA (una vía) seguido del test de Sidak. #P<0,05; ##P<0,01 comparando respecto al grupo control HO-1^{+/+}. ANOVA, de una vía, test de Tukey.

Los niveles de **IL-1β** y **TNFα** en tejido también se elevan significativamente al inducirse la artritis, pero no se observan diferencias llamativas entre los diferentes grupos (Figura 46).

En el caso de la IL-10 (Figura 47) observamos que los valores de esta citocina disminuyen de forma similar en todos los grupos experimentales tras inducir la artritis.

La quimiocina CXCL-1 (también conocida como KC) está muy elevada en el grupo HO-1^{+/-} artrítico observándose diferencias importantes tanto con respecto al control, como al grupo HO-1^{-/-}. A nivel local, las diferencias de esta quimiocina son más llamativas que en suero (ver Figura 47). CXCL-1 es un potente quimioatrayente, crítico para la movilización y la desgranulación de neutrófilos, así como en la permeabilización vascular y la angiogénesis. Además puede actuar como un quimioatrayente para los precursores de osteoclastos. Por tanto, CXCL-1 juega un papel crítico en el desarrollo de la artritis experimental a través del reclutamiento de neutrófilos mediado por CXCR2 en el sitio de la lesión.

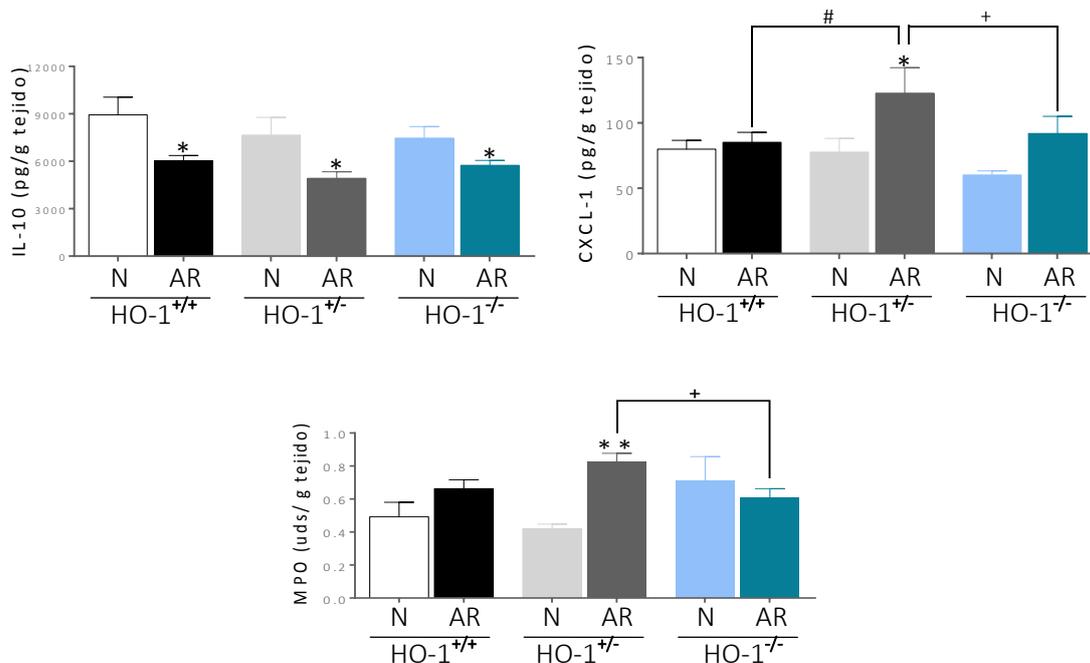


Figura 47. Niveles de mediadores analizados en homogenizado de los patas a día 10 desde la inducción del proceso artrítico. Datos representados como media \pm SEM (naïve: n=4 y artrítico: n=10) *P<0,05, **P <0,01, análisis ANOVA de una vía seguido del test de Sidak para comparar cada grupo con su respectivo naïve. #P<0,05; comparando con el grupo control HO-1^{+/+}, +P<0,01 respecto al grupo artrítico HO-1^{+/-}, mediante ANOVA y test de Tukey.

El grado de infiltración de PMNs en las articulaciones se puede determinar midiendo los niveles de mieloperoxidasa (MPO). Esta enzima es responsable de la actividad microbicida de las células PMNs contra un amplio espectro de organismos. En los PMNs

estimulados, la MPO cataliza la producción de ácidos hipohalogenosos, principalmente ácido hipocloroso, y otros intermedios tóxicos que aumentan poderosamente la actividad microbida (De Young, Kheifets et al. 1989). No es de extrañar que los mayores niveles de MPO los presente el grupo HO-1^{+/-} puesto que es el grupo que mostraba una mayor inflamación en la articulación, que suele ir asociada a una mayor infiltración celular en el foco inflamatorio (Figura 47).

El LTB₄ se produce en respuesta a mediadores inflamatorios y es capaz de inducir la adhesión y activación de leucocitos en el endotelio, así como de inducir la formación de especies reactivas de oxígeno y la liberación de enzimas lisosómicas por estas células. Como podemos observar en la figura 48 los ratones HO-1^{-/-} artríticos muestran un aumento considerable de LTB₄ con respecto a los ratones naïve. En el resto de grupos no se observan variaciones importantes.

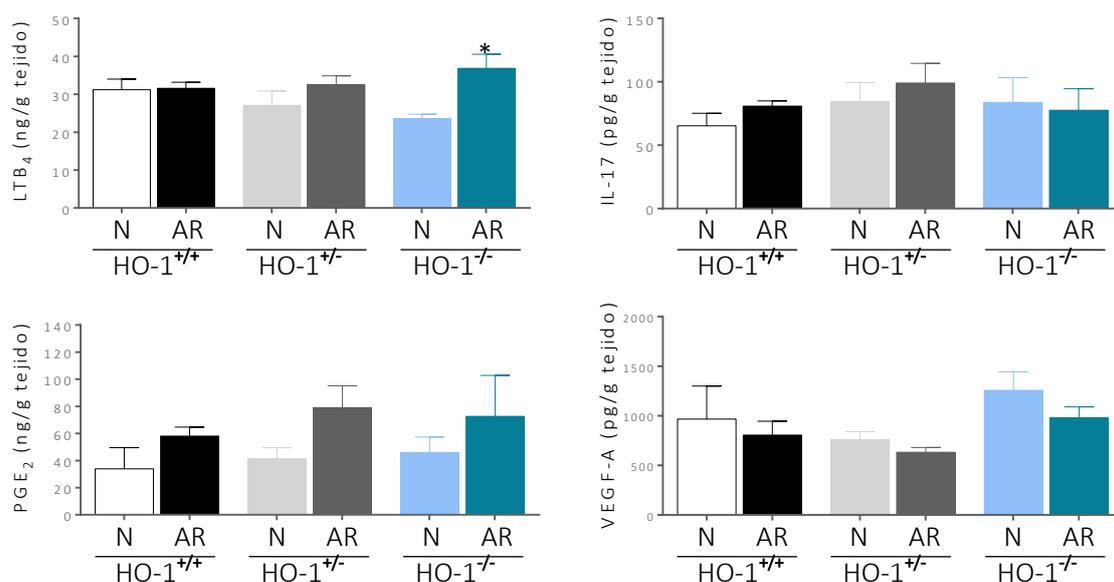


Figura 48. Niveles de mediadores inflamatorios analizados en homogenizado de los patas a día 10 desde la inducción del proceso artrítico. Datos representados como media \pm SEM (naïve: n=4 y artrítico: n=10) *P<0,05 análisis ANOVA de una vía seguido del test de Sidak para comparar cada grupo con su respectivo naïve.

Por último, los niveles de IL-17, PGE₂ y VEGF-A no mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 48). En el caso de la IL-17 y la PGE₂ los resultados coinciden con los obtenidos en el suero de los ratones obtenido a día 10

desde la inducción de la artritis. El factor de crecimiento vascular endotelial-A (VEGF-A) se considera el principal inductor del crecimiento de vasos sanguíneos en el proceso de angiogénesis y vasculogénesis, además también participa en el crecimiento celular endotelial. En el suero (Figura 42), los niveles de VEGF estaban disminuidos en el grupo KO artrítico, posiblemente este descenso sea debido a otra de las isoformas del VEGF, y no esté causado por el VEGF-A ya que en homogeneizado de pata no se han observado diferencias entre los grupos.

4.2.1.6 Estudio histológico de tobillo en ratones artríticos HO-1^{-/-}, HO-1^{+/-} y HO-1^{+/+}

El estudio histológico se llevó a cabo en la articulación de tobillo de ratón mediante tinciones con hematoxilina/eosina o safranina *O/fast green* según el parámetro a analizar. Como podemos observar en las imágenes, los ratones sanos no presentan ninguna alteración en su articulación (Figura 49). Sin embargo, en los ratones artríticos podemos apreciar un infiltrado celular masivo así como un significativo exudado celular en el espacio sinovial, siendo el grupo heterocigótico, el que presenta, claramente los mayores niveles (Figura 49, E).

En los cortes histológicos de tobillo teñidos con safranina *O/fast green*, podemos analizar la afectación del cartílago. Como se observa en la figura 49 (P y Q) los ratones artríticos HO-1^{+/-} sufren una depleción del proteoglicano que compone el cartílago articular mucho más acusada que el resto de grupos.

En la gráfica de la figura 50, podemos comparar los datos extraídos del análisis histológico, donde se observa que, todos los grupos experimentan un gran aumento del infiltrado y exudado sinovial, pero el grupo heterocigótico es el que muestra el cambio más significativo; de la misma manera, la depleción de proteoglicano es mayor en este grupo.

Estos datos concuerdan con lo obtenido en un primer momento en el estudio macroscópico, donde observamos cómo los ratones del grupo experimental heterocigótico presentaba los valores más elevados en cuanto a inflamación y edema en sus patas traseras (Figura 50).

4. Resultados

4.2 Estudio de la deficiencia de HO-1 en la artritis experimental

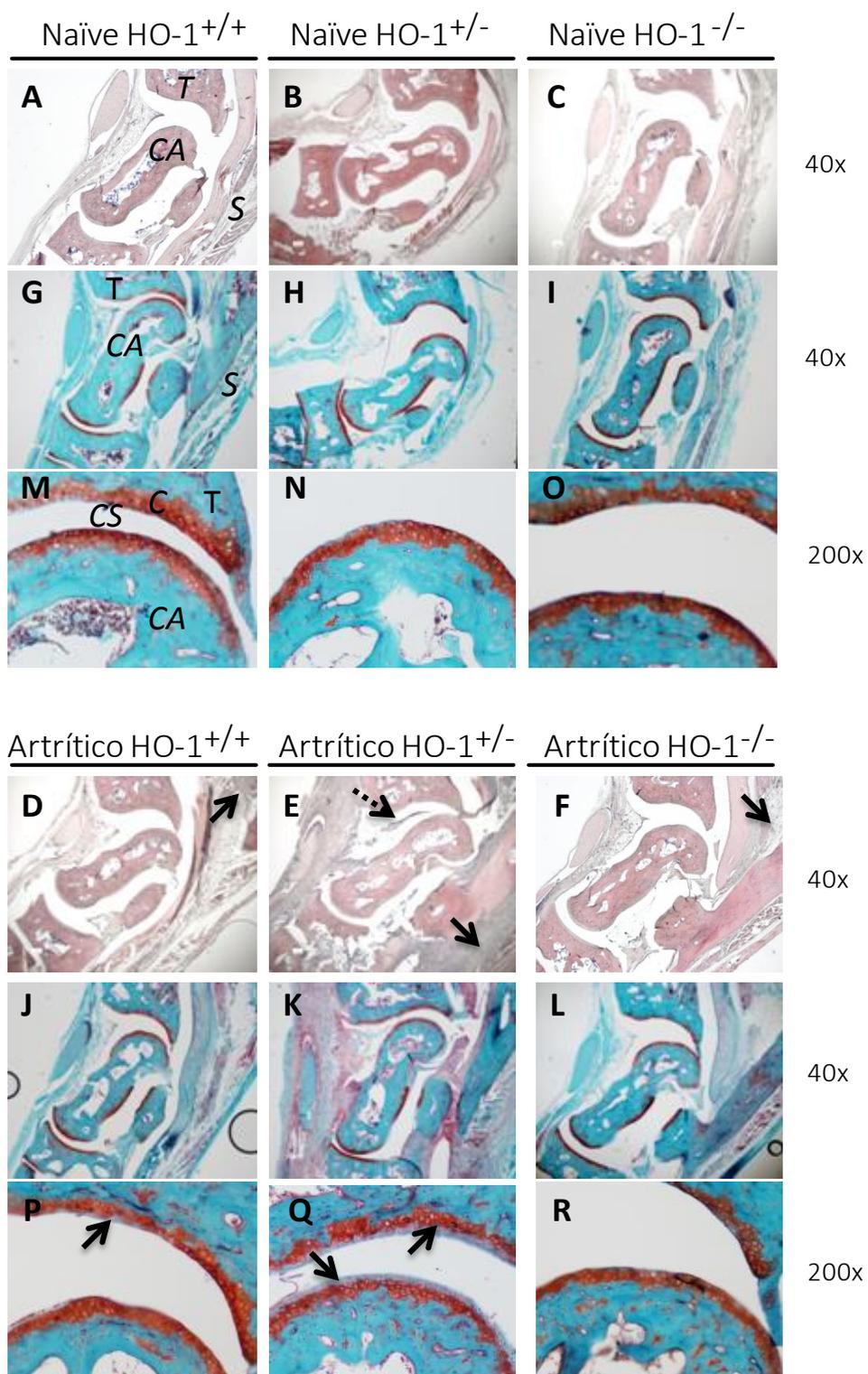


Figura 49. Secciones tisulares frontales de tobillo teñidas con hematoxilina-eosina (A-F) o safranina O-fast green (G-R). A día 10 del proceso artrítico. D, E, F = Marcada infiltración sinovial (flecha continua). E = Marcado exudado (flecha punteada). P y Q= Marcada depleción de proteoglicano (flecha discontinua). T = tibia, CA = calcáneo, C = cartílago, S = membrana sinovial, CS = cavidad sinovial.

En este estudio histológico no se identificaron valores significativos de erosión de cartílago ni de muerte de condrocitos en los tobillos de los ratones artríticos, debido a que este modelo artrítico es más breve de lo necesario para poder obtener valores significativos de estos parámetros.

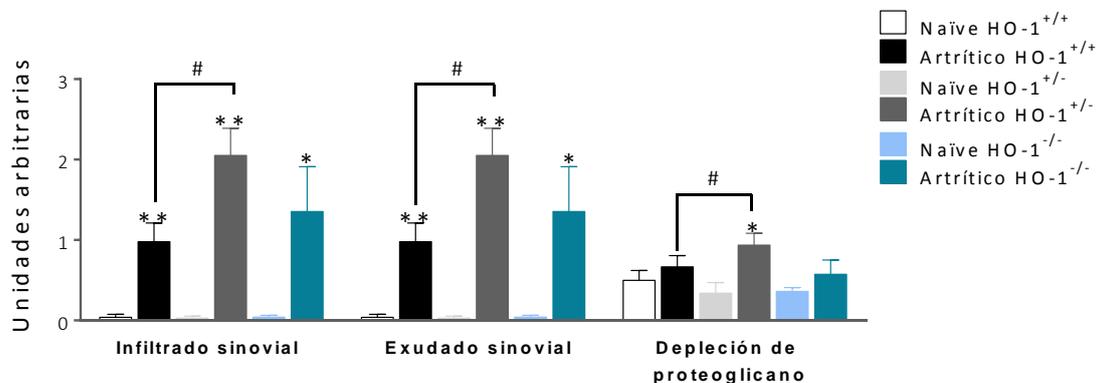


Figura 50. Evaluación histológica del tobillo a día 10 del proceso artrítico. El infiltrado y exudado sinovial y la depleción de proteoglicano fueron evaluados utilizando una escala de 0-3. Valores representados como media \pm S.E.M, n=4-10. *P<0,05; **P<0,01; comparando cada grupo de animales artríticos con su respectivo grupo de animales no artríticos mediante análisis de ANOVA seguido del test de Sidak de múltiple comparación y #P<0,05 para comprar cada grupo con el grupo control HO-1^{+/+} mediante ANOVA de dos vías, múltiple comparación de Tukey.

4.2.1.7 Análisis de la expresión de genes antioxidantes en los ratones artríticos

Tanto la deficiencia parcial, como completa de HO-1 condujo al aumento de la susceptibilidad a la artritis; sin embargo, algunos efectos eran más acusados en los animales HO-1^{+/-}. Por este motivo decidimos comprobar la expresión de otros genes antioxidantes en los animales artríticos de los distintos genotipos. Mediante la utilización de PCR a tiempo real, analizamos la expresión de **tiorredoxina-2 (Thrx-2)**, **glutación S-transferasa-1 (GSTA-1)**, **glutación reductasa (GSR)**, **superóxido dismutasa-2 (SOD-2)**, **ferritina** y **catalasa** en el hígado de los animales artríticos. Todas estas enzimas poseen propiedades antioxidantes y detoxificantes, ya que actúan facilitando la reducción, conjugación, dismutación, almacenamiento o descomposición de proteínas y moléculas oxidantes o tóxicas.

Curiosamente, observamos que en los ratones que carecen de un alelo de HO-1, pero no en los animales HO-1^{-/-}, la expresión de algunos genes antioxidantes estaba disminuida. Tanto la expresión de ferritina como de GSTA-1 era significativamente

menor en este grupo y se observó además cierta tendencia a la regulación a la baja de SOD-2 ($P = 0.07$) (Figura 51). Concretamente, la ferritina participa en los procesos de almacenamiento de Fe^{2+} , y la GSTA-1 pertenece a una familia de enzimas de gran importancia en mecanismos de desintoxicación celular, eliminando xenobióticos o sustancias nocivas para las células.

Por otro lado, la expresión de Thrx-2, GSR y catalasa era similar en los ratones de todos genotipos. Los cambios observados en los animales HO-1^{+/-} después de la inducción de la artritis sugieren que el aumento de la sensibilidad al desarrollo de artritis puede ser resultado de la disminución sistémica de antioxidantes, unida a la disminución de la actividad de HO-1.

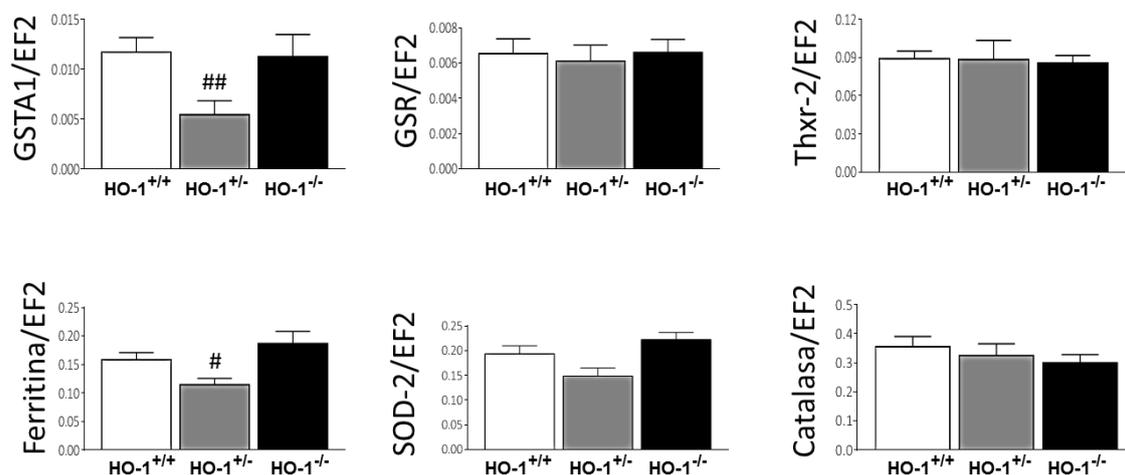


Figura 51. Niveles de expresión génica en el día 10. Niveles de RNAm relativos de GSTA1, GSR, ferritina, Thxr-2, SOD-2 y catalasa, medidos en los hígados de ratones artríticos a día 10 por PCR a tiempo real. Los resultados fueron normalizados respecto al factor de elongación 2 (EF2) y expresados como $2^{-\Delta Ct}$. Datos representados como media \pm S.E.M, $n=8-9$. # $P < 0,05$; ## $P < 0,01$ comparando con los animales control wild type mediante ANOVA de una vía y test de Tukey.

4.2.2. ESTUDIO EN RATONES HO-1 KNOCKOUT CONDICIONALES (HO-1^{KO-M})

Según los datos obtenidos en este primer experimento en ratones deficientes en HO-1, podemos deducir que la carencia de esta enzima está muy relacionada con una mayor susceptibilidad por parte del individuo a sufrir una artritis más severa. No obstante, también observamos que en los ratones KO, debido a la carencia total de HO-1 en su

organismo, se pueden ver afectados múltiples órganos y sistemas, lo que supone una dificultad a la hora de definir cuál es el mecanismo de acción de HO-1 en el proceso artrítico. Por otro lado, los ratones heterocigóticos que sí expresaban HO-1 en su organismo pero en menor medida que los ratones control, también mostraban valores de daño articular muy importantes.

Por ello, decidimos continuar el estudio de la implicación de esta enzima en el proceso artrítico, trabajando con ratones que no fueran capaces de expresar HO-1, únicamente en un tipo celular concreto. En esta otra serie de experimentos utilizamos ratones carentes de HO-1 exclusivamente en las células de la línea mieloide, como son monocitos y macrófagos, granulocitos, eritrocitos y plaquetas y ciertas células dendríticas, todas ellas implicadas en la respuesta inmune e inflamatoria. Denominamos a estos ratones HO-1^{KO-M} (ver Material y métodos, apartado 3.1.1 c).

Estos ratones, también conocidos como **KO condicionales para HO-1**, no sufren las alteraciones funcionales que presentaban los *KO* para HO-1, como anemia, alteraciones oculares, pérdida de peso, problemas en hígado o riñones etc... Puesto que la carencia en la expresión de HO-1 se limita principalmente a los monocitos, macrófagos y granulocitos, su estudio nos permite obtener información referente al mecanismo implicado en la inflamación de las articulaciones y al proceso inmune asociado.

4.2.2.1. EXPRESIÓN DE HO-1 EN MACRÓFAGOS PERITONEALES EN RATONES HO-1^{KO-M}

Tras realizar los cruces generacionales pertinentes, obtuvimos una población de ratones que genotipamos y comprobamos que no expresaban HO-1 en las células de la línea mieloide (Material y métodos apartado 3.1.1. c). Sin embargo, para corroborar esta carencia de expresión, durante cada experimento decidimos extraer, en el momento de sacrificar los animales, los macrófagos peritoneales para realizar un análisis inmunocitoquímico (ver Material y métodos, apartado 3.2.1) y comprobar de esta manera, que no expresaban HO-1. Para ello, tras extraer los macrófagos peritoneales, estos se sembraron y se estimularon con PMA 0,1 µg/ml. Se utilizó un control positivo, es decir, macrófagos peritoneales de ratones C57B/L6 y un control negativo, donde no

se añadió el anticuerpo primario antiHO-1. El resultado de esta tinción por inmunofluorescencia puede observarse en la figura 52.

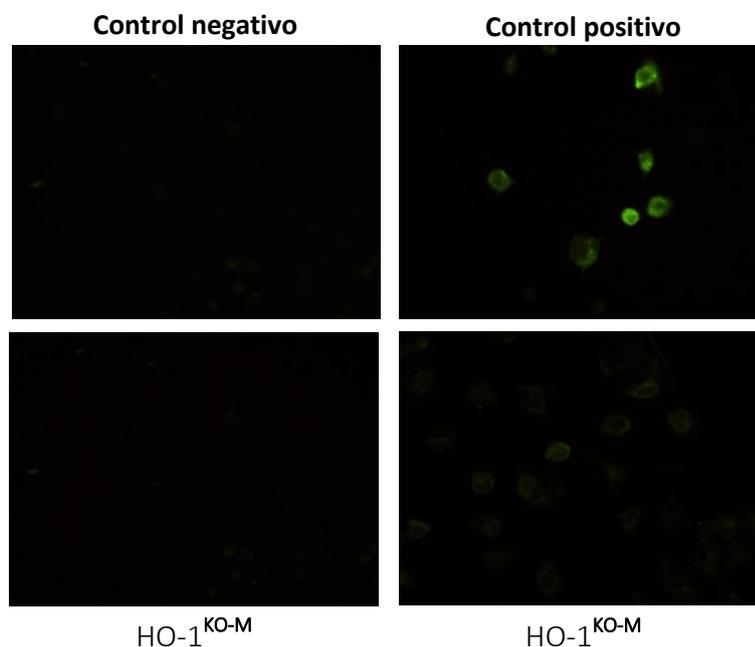


Figura 52. Imágenes de tinción de HO-1 por inmunofluorescencia en macrófagos peritoneales de ratones HO-1^{KO-M}, comparando con un control positivo y un control negativo. Esta tinción se llevó a cabo en macrófagos peritoneales estimulados con PMA para favorecer la expresión de HO-1.

Podemos observar que las células de los ratones HO-1^{KO-M} presentan una fluorescencia mucho menor a la del control positivo, signo de que la expresión de HO-1 no se produce o se produce de manera muy limitada en los macrófagos peritoneales.

Para complementar este estudio, se realizaron varios análisis con ratones de la misma camada, que consistían en extraer gran cantidad de macrófagos y neutrófilos obtenidos de la cavidad peritoneal, para su marcaje con distintos fluorocromos y determinar la expresión de HO-1 en estas células mediante citometría de flujo. De esta manera, cuantificamos la expresión de HO-1 en los ratones condicionales. Este análisis se llevó a cabo estimulando la infiltración de células en la cavidad peritoneal con tioglicolato 3% y tras su extracción a las 96h, se sembraron las células y se estimularon con hemina que es un potente estimulador de la expresión de HO-1 (consultar Material y métodos, apartado 3.2.1 b). Como se observa en la figura 53, apenas se detectan valores de HO-1 en los ratones condicionales, mientras que los controles, muestran altos niveles de esta enzima.

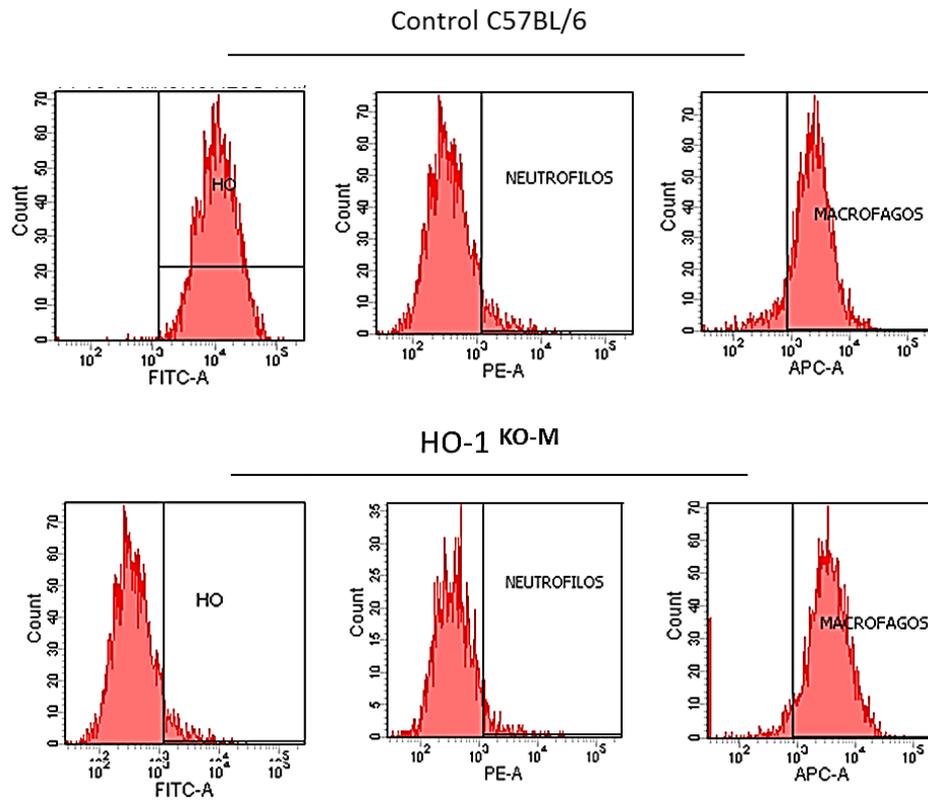


Figura 53. Análisis por citometría de flujo de la expresión de HO-1 en los macrófagos y neutrófilos de la cavidad peritoneal. Tras la estimulación de la migración celular a la cavidad peritoneal con tioglicolato 3%, y la posterior extracción del exudado pasadas 96h, observamos cómo la población mayoritaria de células en este exudado son macrófagos en ambos genotipos de ratón. La cantidad de neutrófilos a este tiempo es prácticamente nula, al igual que la expresión de HO-1 en los ratones condicionales.

4.2.2.2. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL MODELO DE BOLSA DE AIRE EN RATONES

HO-1^{KO-M}

Dado que el modelo de artritis K/BxN es un modelo complejo, y que no existían referencias bibliográficas relevantes sobre el uso de estos ratones condicionales en modelos artríticos, nuestro primer paso, fue realizar un estudio previo en otro modelo de inflamación más sencillo y rápido. El modelo elegido para este objetivo fue el conocido como “bolsa de aire en ratón” o MAP (*mouse air pouch*). Dicho modelo, simula un proceso inflamatorio agudo localizado, con implicación de macrófagos y neutrófilos. Consiste en la generación de una bolsa de aire subcutánea en la piel del ratón y la administración de un agente irritante que activa la migración de células del sistema

inmune y la liberación de enzimas y mediadores inflamatorios que quedan retenidos en dicha bolsa actuando como cámara de cultivo (ver material y métodos, apartado 3.1.3).

Este modelo, ampliamente utilizado, no se había empleado en ratones de la cepa C57BL/6 ni en ratones condicionales para HO-1 en la línea mieloide, por dicho motivo, decidimos realizar un estudio preliminar en el que analizar la respuesta del organismo de dichos ratones C57BL/6 a la administración del agente irritante y de este modo, seleccionar las mejores condiciones para el posterior uso con los ratones condicionales

4.2.2.2.1 Estudio del modelo MAP en ratones C57BL/6 a distintos tiempos

En este primer estudio, desarrollamos la bolsa de aire en el dorso del animal tal y como se detalla en el apartado anterior de material y métodos 3.1.3. Una vez reinflada la bolsa de aire, se administró el agente irritante, zimosán 1% y posteriormente se sacrificaron los animales a distintos tiempos (8, 24 y 48 horas) tras su administración. Tras la extracción del exudado de la bolsa de aire, se analizó la migración de células en el mismo y la liberación de mediadores inflamatorios. Con las células obtenidas del exudado se determinó la expresión proteica mediante *Western Blot*.

Como se observa en la figura 54, se produjo una masiva **migración celular** en la bolsa de aire de los ratones a los que se les había administrado el agente irritante. Esta migración fue mayor a las 8 y 24 horas tras la administración del zimosán 1%, aunque a las 48 horas todavía se mantenían niveles altos.

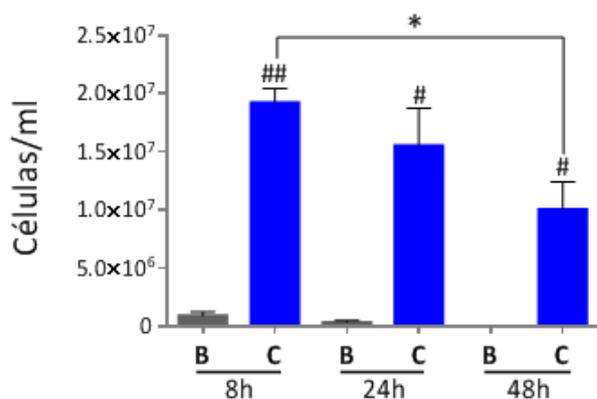


Figura 54. Migración celular en el exudado de la bolsa a diferentes tiempos. B: Blanco, C: control estimulado con zimosán. Datos representados como media \pm S.E.M. $n=8$. * $P<0,05$; comparando los grupos control a las distintos tiempos entre sí. ANOVA, test de Tukey. # $P<0,05$; ## $P<0,01$ si comparamos los grupos blanco con su respectivo control. ANOVA, test de Sidak.

Se analizaron además los niveles de los mediadores más relevantes en el proceso inflamatorio, como son IL-1 β , TNF α , CXCL-1 (o IL-8 de ratón) e IL-10 (Figura 55).

La concentración de estas citocinas, aumentó considerablemente al añadir el agente irritante. En el caso de IL-1 β , IL-10 y CXCL-1, sus niveles fueron mayores en los estadios iniciales (8h) y fueron descendiendo según pasaban las horas. La concentración de IL-1 β , desciende fuertemente pasadas las primeras 24 horas, sin embargo la citocina CXCL-1 va disminuyendo de forma más progresiva. Por otro lado, los niveles de IL-10 se mantuvieron elevados durante las primeras 24 horas y posteriormente descendieron ligeramente. Hay que destacar que en todos estos casos, los valores de estas citocinas llegadas las 48 horas tras la administración del agente irritante, eran bastante elevados.

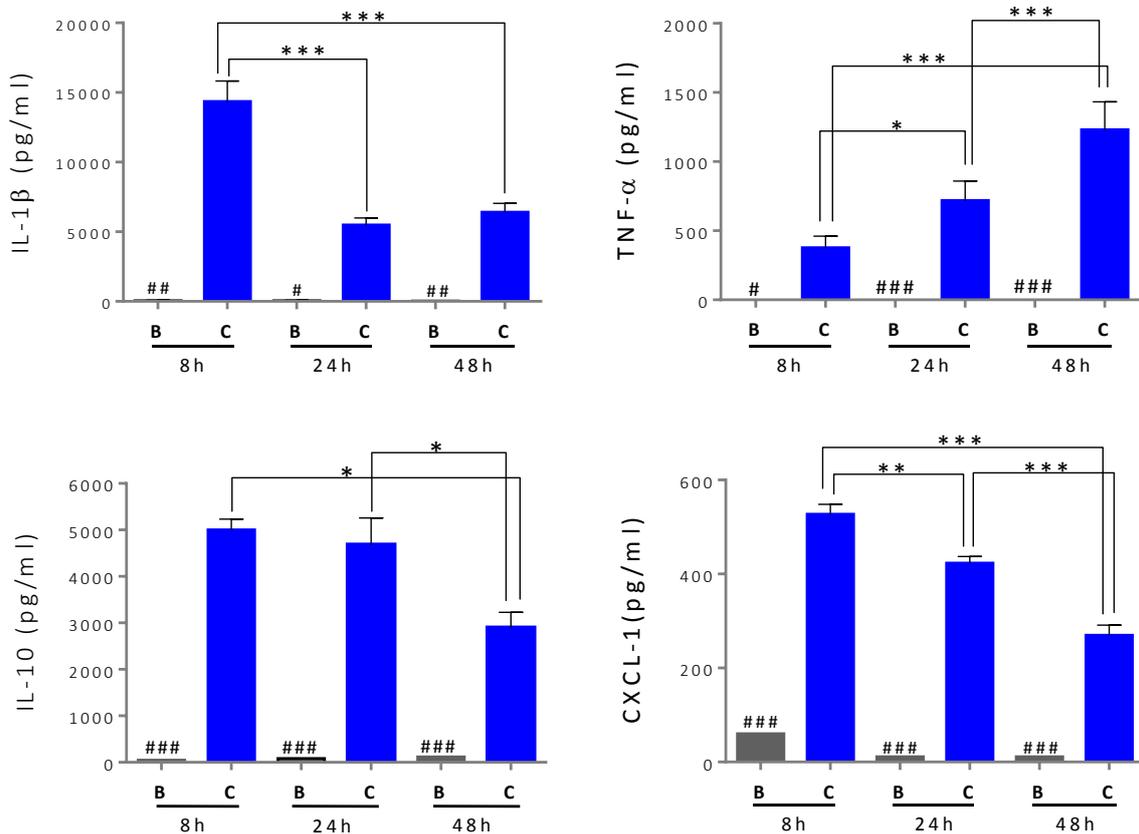


Figura 55. Concentración de citocinas en el exudado de la bolsa a distintos tiempos. B: Blanco, C: control estimulado con zimosán. Datos representados como media \pm S.E.M., n=8. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 comparando los grupos control a las distintos tiempos entre sí. ANOVA, test de Tukey. #P<0,05; ##P<0,01; ###P<0,001 si comparamos los grupos blanco con su respectivo control. ANOVA, test de Sidak.

En el caso de $\text{TNF}\alpha$, y como cabría esperar de una citocina que actúa en las fases más tardías del proceso inflamatorio, se produjo un aumento progresivo de los niveles de este mediador a medida que se aumenta el tiempo desde la administración del agente irritante, alcanzándose su máximo a las 48 horas desde la administración de zimosán. (Figura 55). También se determinó la concentración de IL-4 en el exudado de la bolsa de aire, pero no se encontraron niveles detectables de esta interleucina en las muestras.

Tanto los niveles de PGE_2 como de **nitrito**, son también muy relevantes en los procesos inflamatorios, por este motivo se analizaron sus valores en el exudado de la bolsa de aire a distintos tiempos (Figura 56).

Cuando se induce la enzima **iNOS** con un agente inflamatorio, se produce la liberación de **NO**, siendo los valores de nitrito una forma indirecta de medir su concentración. Según esto, se midieron los niveles de **nitrito**, y se observaron diferencias significativas de los grupos control a las 8 y 48 horas en comparación con el mismo grupo a las 24 horas, que fue el momento en el que se observaron los valores más elevados de este mediador inflamatorio. Los valores de PGE_2 aumentaron significativamente a las 8 y 24 horas en los grupos control respecto a los animales sin estímulo a esos mismos tiempos. Aunque no se observan diferencias significativas entre los grupos control, sí se aprecia una clara tendencia al descenso de los niveles de PGE_2 a las 48 horas desde la administración de zimosán (Figura 56).

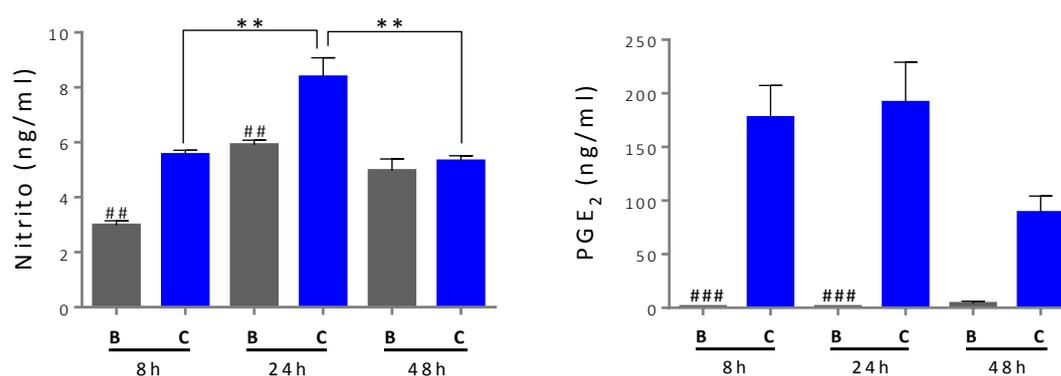


Figura 56. Concentración de nitrito y PGE_2 a diferentes tiempos. B: Blanco, C: control estimulado con zimosán. Datos representados como media \pm S.E.M., $n=8$. * $P<0,05$; ** $P<0,01$ comparando los grupos control a las distintos tiempos entre sí. ANOVA, test de Tukey. ## $P<0,01$; ### $P<0,001$ si comparamos los grupos blanco con su respectivo control. ANOVA, test de Sidak.

Uno de los parámetros más importantes a considerar en nuestro estudio es la expresión de HO-1. En este caso, mediante la técnica de *Western Blot*, medimos los niveles de esta enzima en las células extraídas de la bolsa de aire (ver Material y métodos, apartado 3.1.4.3 g). A las 24 horas se produce la mayor expresión de HO-1, enzima antioxidante y antiinflamatoria (Figura 57).

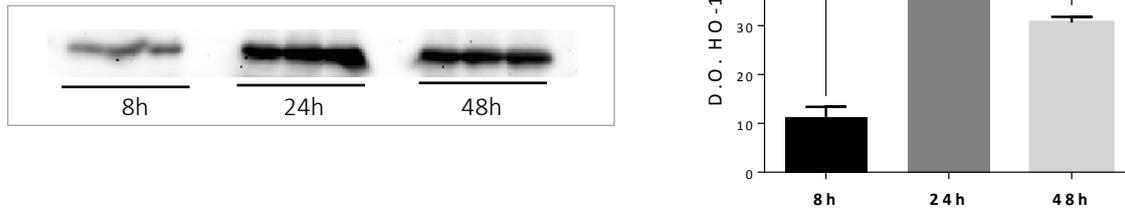


Figura 57. *Western Blot* de HO-1 analizado en el exudado de la bolsa de aire a 8, 24 y 48 horas desde la administración del agente irritante zimosán. Densidad óptica de la expresión de HO-1. Datos representados como media \pm S.E.M., $n=8$. ** $P<0,01$, *** $P<0,001$. ANOVA de una vía seguido del test de Tukey.

Según los resultados obtenidos, la mayor parte de los mediadores, están aumentados en los tiempos iniciales desde la administración del agente inflamatorio, es decir entre las 8 y 24 horas, y además la expresión de HO-1 es máxima a las 24 horas. Por estos motivos, para el posterior desarrollo de este modelo con los ratones condicionales en HO-1 (HO-1^{KO-M}), seleccionamos el tiempo de 18 horas desde la administración de zimosán para sacrificar a los ratones. Este es un tiempo intermedio entre las 8 y 24 horas, que es el intervalo en el que hemos visto que se producen los mayores niveles de mediadores y expresión de enzimas y que consideramos es el que más información nos puede aportar. Esto nos va a permitir estudiar cómo afecta la carencia de esta enzima por parte de macrófagos y neutrófilos en el desarrollo del proceso inflamatorio.

4.2.2.2 Análisis de los efectos producidos por la carencia de HO-1 en las células de la línea mieloide en el modelo de MAP

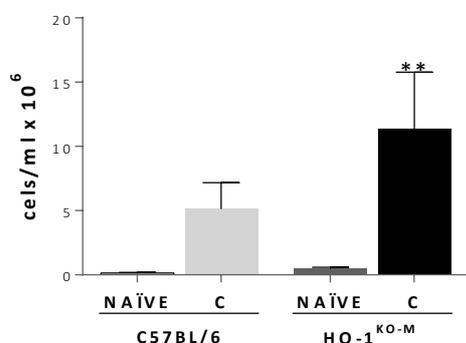
Una vez decidido cuál era el tiempo idóneo para obtener los resultados de forma más precisa con el modelo de MAP, procedimos con el desarrollo de este mismo modelo en los ratones condicionales para HO-1. Utilizamos ratones control C57BL/6 y ratones HO-1^{KO-M} a los que indujimos el proceso inflamatorio agudo en la bolsa de aire. Se extrajo

sangre a los ratones de donde obtuvimos el suero y una vez sacrificados (a las 18 horas desde la administración del agente inflamatorio) recogimos el exudado de la bolsa de aire. Tanto en suero como en las células del exudado analizamos los niveles de distintos mediadores inflamatorios.

Análisis de mediadores inflamatorios en MAP

Como hemos visto anteriormente, durante el modelo de MAP, al añadir el agente irritante en la bolsa de aire, se genera una migración de células del sistema inmune hacia la bolsa de aire, actuando como una cámara de cultivo celular (Ver material y métodos, apartado 3.1.3). Estas células se cuantificaron con un contador de células y se determinó la liberación de los mediadores inflamatorios en este exudado mediante técnicas de ELISA y RIA.

Como se observa en la figura 58, el zimosán, induce la migración de células del sistema inmune hacia la bolsa de aire, la cuantificación de esta migración revela que en el grupo de ratones condicionales para HO-1 hay una mayor movilización celular hacia la bolsa de aire.



*Figura 58. Análisis de la migración celular en la bolsa de aire de los ratones de los distintos grupos. Naïve: blanco, C: control al que le administramos zimosán. Datos representados como media \pm S.E.M., $n=5$. ** $P<0,01$ en comparación con su respectivo grupo naïve. ANOVA (una vía) Test de Sidak.*

Si analizamos los niveles de mediadores inflamatorios liberados en la bolsa de aire, vemos como en todos los casos, el zimosán causa una gran liberación de citocinas, y en la mayoría de ellas, los niveles son más elevados en el grupo de ratones condicionales para HO-1. Los valores de **IL-1 β** , **PGE₂**, **TNF α** (Figura 59) y **MMP-3** (Figura 60) son significativamente mayores en los animales HO-1^{KO-M}, comparándolo con el grupo control C57BL/6. Además, los niveles de **MMP-3** medidos en suero muestran diferencias muy significativas entre el grupo HO-1^{KO-M} y el control C57BL/6 (Figura 60). Para la citocina **CXCL-1**, no se observaron diferencias llamativas entre los grupos estimulados con zimosán (Figura 59).

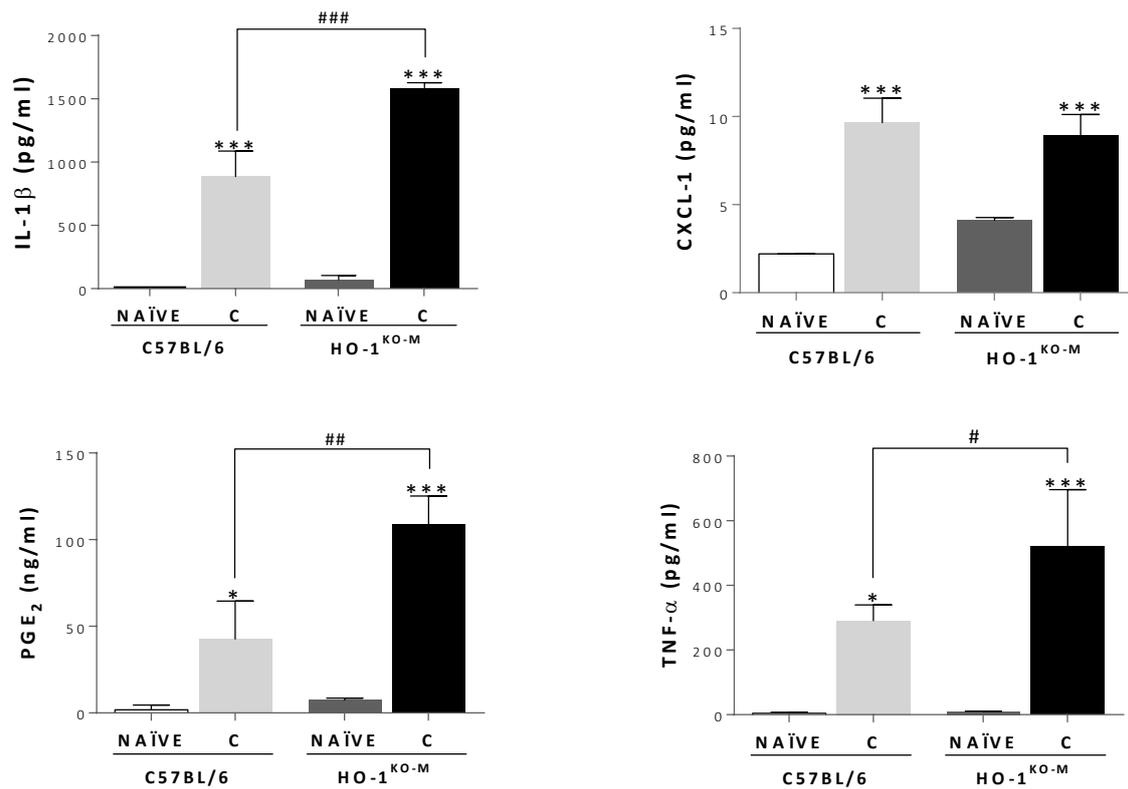


Figura 59. Determinación de distintos mediadores inflamatorios en el exudado de la bolsa de aire analizados a las 18 horas tras la inducción del proceso inflamatorio. Naïve: blanco, C: control al que le administramos el agente irritante zimosán. Datos representados como media \pm S.E.M., $n=5$. * $P<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ en comparación con su respectivo naïve. # $P<0,05$; ## $P<0,01$; ### $P<0,001$ en comparación con el grupo control C57BL/6. ANOVA (una vía) Test de Sidak.

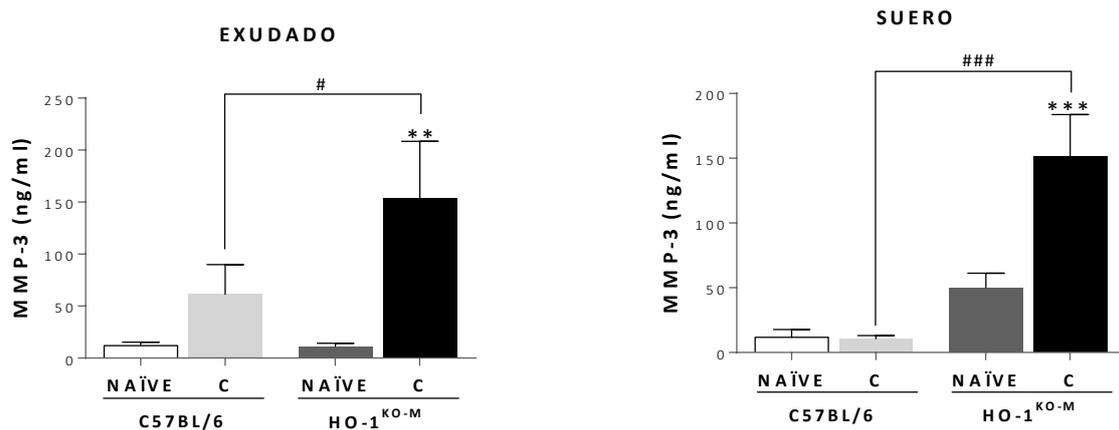


Figura 60. Determinación de MMP-3 en el exudado de la bolsa de aire analizados a las 18 horas tras la inducción del proceso inflamatorio y en suero. Naïve: blanco, C: control al que le administramos el agente irritante zimosán. Datos representados como media \pm S.E.M., $n=5$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ en comparación con su respectivo naïve. # $P<0,05$; ### $P<0,001$ en comparación con el grupo control C57BL/6. ANOVA (una vía) Test de Sidak.

Un dato importante en este estudio, es el análisis de la **expresión de HO-1** en el exudado celular de la bolsa de aire, esto se determinó mediante técnica de *Western Blot* (Figura 61). Los resultados del *Western Blot*, confirman que se produce una menor expresión de HO-1 en el exudado de la bolsa de aire de los ratones condicionales, en comparación con el grupo control, como cabría esperar. Sin embargo, esta expresión no es nula debido probablemente a otras células que existen en este exudado y sí expresan esta enzima.

Con estas pruebas queda reflejado que la implicación de HO-1 en la regulación del proceso inflamatorio es fundamental, puesto que los ratones condicionales para HO-1 en las células de la línea mieloide, muestran un aumento en la liberación de mediadores inflamatorios en el modelo agudo de inflamación conocido como bolsa de aire en ratón.

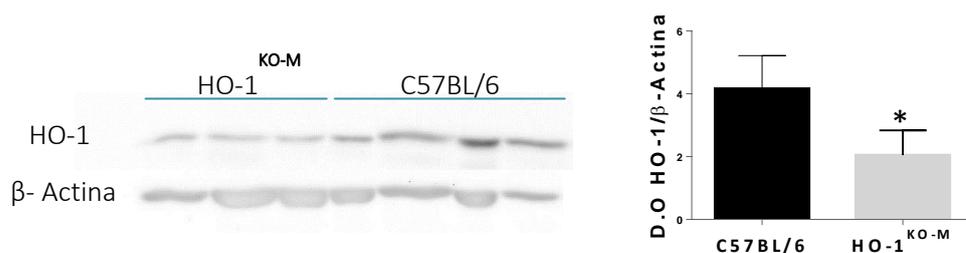


Figura 61. Determinación de la expresión de HO-1 en las células del exudado de la bolsa de aire en ratones C57BL/6 y condicionales para HO-1 en células de la línea mieloide mediante técnica de *Western Blot*. Densidad óptica de la expresión de HO-1 y su comparativa con β -Actina. Datos representados como media \pm S.E.M. * $P < 0,05$. Prueba T de Student desapareada (two tailed).

4.2.2.3. RESULTADO DEL MODELO DE ARTRITIS EXPERIMENTAL POR TRANSFERENCIA DE SUERO K/BxN EN RATONES HO-1^{KO-M}

Una vez confirmada la implicación de HO-1 en el modelo de MAP en ratones condicionales para HO-1 en las células de la línea mieloide, el siguiente paso era estudiar los efectos que la carencia de HO-1 en estas células inmunes, produciría sobre un modelo animal de enfermedad autoinmune como es el modelo de artritis por transferencia de suero K/BxN. En este modelo, como hemos visto anteriormente, al administrar el suero procedente de ratones espontáneamente artríticos, (suero K/BxN) el cual contiene importantes cantidades de anticuerpos, se desencadena un proceso

inflamatorio en la articulación principalmente del tobillo. Este proceso desencadenado por las Ig del suero K/BxN, se desarrolla con la participación de los neutrófilos, macrófagos y células mastocíticas principalmente, sin apenas implicación por parte de los linfocitos, por tanto resulta un modelo relativamente sencillo y práctico para analizar la implicación que puede tener la carencia de la expresión de HO-1 en neutrófilos y macrófagos durante este proceso inflamatorio y autoinmune.

Se les indujo el proceso artrítico a los ratones condicionales, tanto machos como hembras y a un grupo control formado por ratones C57BL/6 machos, según el protocolo mencionado en Material y métodos, apartado 3.1.2. Tras el desarrollo del proceso inflamatorio en las articulaciones de tobillo y muñeca, se valoró la inflamación de cada pata y finalmente se sacrificaron los animales a día 10 desde la inducción de la artritis. De cada animal se extrajeron muestras de sangre, médula ósea, macrófagos peritoneales y las extremidades para posteriores análisis.

4.2.2.3.1 Puntuación artrítica

Tras la administración del suero K/BxN a los ratones control y condicionales, se observó una inflamación progresiva de las articulaciones del tobillo y la muñeca que valoramos en una escala de 0-2 para cada pata (véase Material y métodos apartado 3.1.2.2). Como podemos observar en la figura 62, en contra de lo que cabría esperar, los ratones del grupo control, mostraban un empeoramiento del proceso inflamatorio ligeramente superior al del grupo de ratones condicionales, aunque sin ofrecer diferencias significativas.

Al analizar estos datos, diferenciando entre el sexo de los ratones del grupo HO-1^{KO-M}, detectamos que el grupo de las hembras desarrollaba la artritis de manera más lenta que los machos y por tanto su pico de inflamación podía retrasarse unos días (Figura 63). Decidimos alargar el proceso artrítico de los ratones condicionales hasta el día 13, donde las hembras alcanzaron su valor más elevado, pero los ratones condicionales macho comenzaban a recuperarse de la enfermedad.

4. Resultados

4.2 Estudio de la deficiencia de HO-1 en la artritis experimental

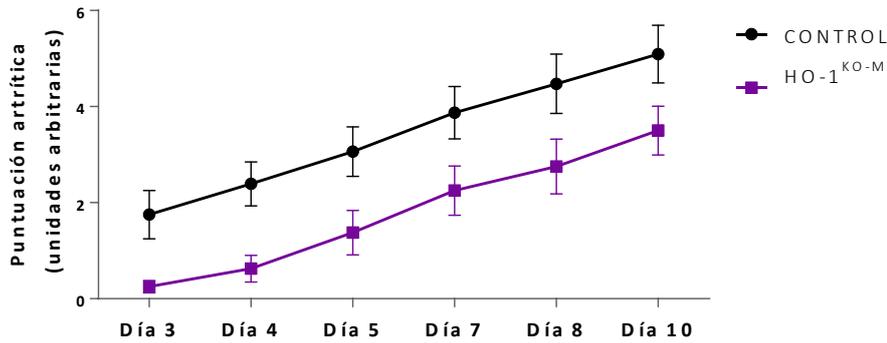


Figura 62. Puntuación macroscópica de las patas delanteras y traseras de ratones artríticos. Puntuación máxima por ratón: 8. Valores representados como media \pm S.E.M. $n=8$. ANOVA (dos vías), test de Sidak.

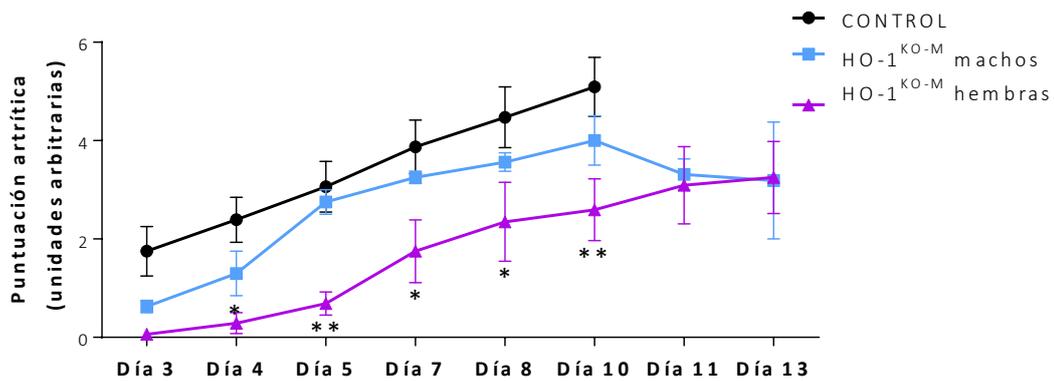


Figura 63. Puntuación macroscópica. Puntuación máxima por ratón: 8. Valores representados como media \pm S.E.M. $n=8$ para el grupo control y $n=4$ para los grupos condicionales. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ en comparación con los animales artríticos del grupo control. ANOVA (dos vías), test de Dunnett.

Estudiando la incidencia del proceso artrítico, se observa como los ratones HO-1^{KO-M} machos, desarrollan el proceso artrítico con mayor velocidad que las hembras, que tardan 7 días en llegar al 100% de incidencia. Los ratones control tienen una incidencia muy similar a la de los ratones condicionales machos, aunque tardan 1 día más en llegar al 100% de individuos artríticos (Figura 64).

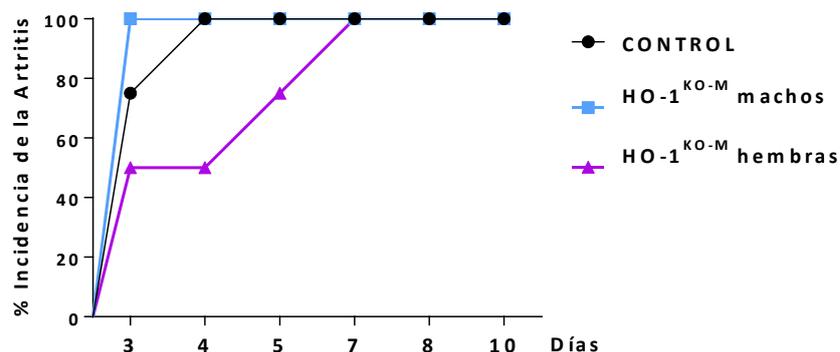


Figura 64. Porcentaje de incidencia al desarrollar la artritis. Analizado en los animales control y condicionales machos y hembras.

Una vez sacrificados los animales se obtuvieron varias muestras: por un lado se separaron las patas tanto traseras como delanteras de donde posteriormente se obtendría el homogeneizado para el análisis de mediadores inflamatorios (véase Material y métodos, apartado 3.1.2.4). Además, de las patas traseras se extrajo la médula ósea para hacer los análisis tanto de estrés oxidativo como los estudios de diferenciación celular a osteoclastos (Material y métodos apartado 3.2.2). Las patas traseras también se utilizaron para los estudios de histología e inmunohistoquímica (Material y métodos apartado 3.1.4.1 y 3.1.4.2). En este caso, también se extrajeron los macrófagos peritoneales de los ratones para la determinación de la expresión de HO-1 en los mismos (Material y métodos 3.2.1).

4.2.2.3.2 Análisis por fluorescencia de la expresión de HO-1 en macrófagos peritoneales

Con el objetivo de corroborar que los ratones condicionales, no expresaban HO-1 en las células del sistema inmune, perteneciente a la línea mieloide, estudiamos mediante tinción de fluorescencia, la expresión de esta enzima, en los macrófagos peritoneales extraídos de los ratones en el momento de sacrificarlos.

Como observamos en las imágenes de la figura 65, en las células de los ratones condicionales, se detectó un nivel muy bajo de fluorescencia, similar a la del control

negativo. Entendemos por tanto, que los macrófagos de estos ratones no son capaces de expresar la enzima HO-1.

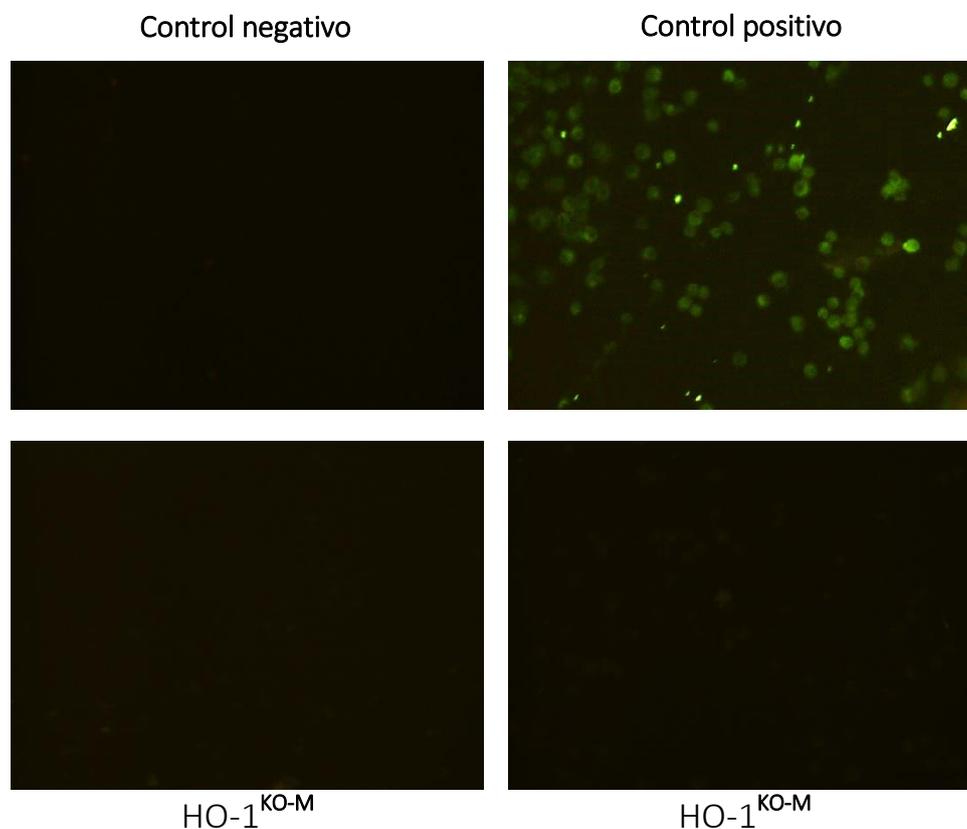


Figura 65. Expresión de HO-1 mediante tinción de fluorescencia en los macrófagos peritoneales. Control positivo: macrófagos procedentes de ratones C57BL/6, control negativo: macrófagos procedente de ratones C57BL/6, dónde se ha bloqueado específicamente la unión del anticuerpo a la enzima HO-1. HO-1^{KO-M}: ratones condicionales.

4.2.2.3.3 Análisis de los mediadores inflamatorios analizados en homogeneizado de pata

La figura 66, muestra los resultados obtenidos al analizar los niveles de **IL-1 β** en el homogeneizado de las patas, tanto traseras como delanteras, de los ratones en estudio. Estos valores hacen referencia a la concentración de esta citocina en el momento del sacrificio de los animales. Al analizar los niveles de IL-1 β en las patas traseras, observamos como los animales control artríticos presentan diferencias significativas respecto al estado sano, pero en los animales condicionales, estas diferencias no se

observan y lo mismo ocurre si diferenciamos entre los condicionales machos y hembras. Sin embargo, al estudiar las patas delanteras, observamos como al separar entre machos y hembras condicionales, los machos artríticos presentan niveles más elevados de IL-1 β que el grupo control.

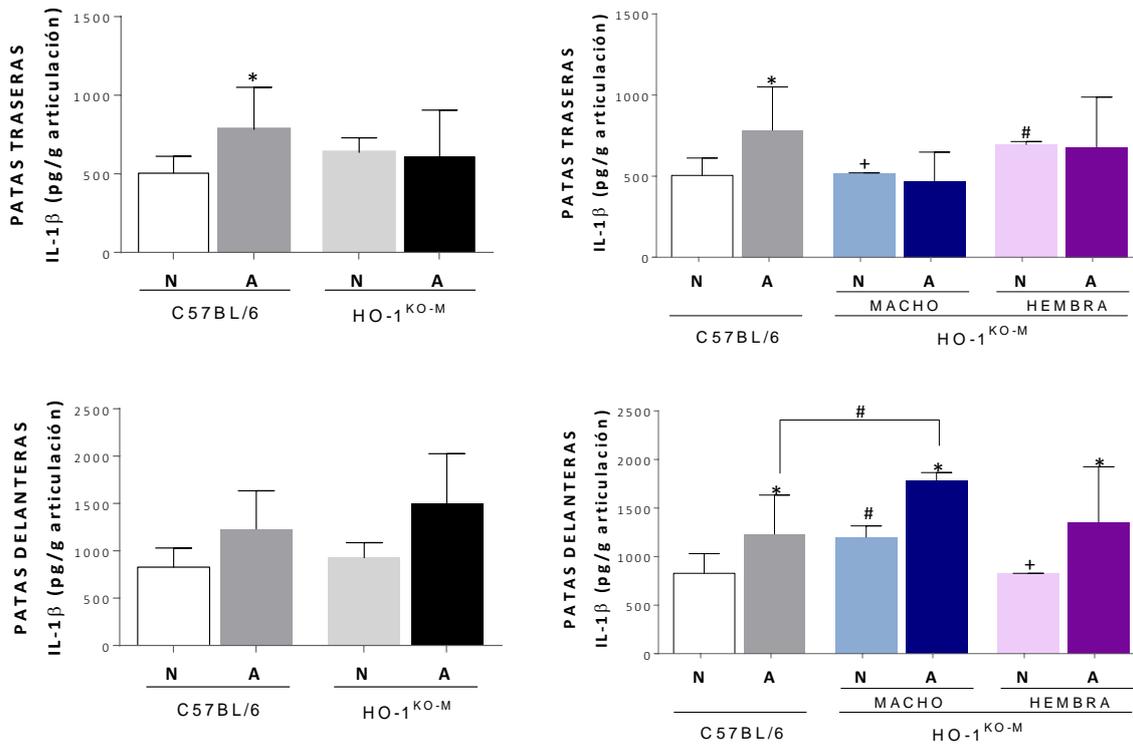


Figura 66. Niveles de IL-1 β en homogeneizado de patas de ratón. C57BL/6: control, HO-1^{KO-M}: condicional, N: naïve, A: artrítico, n=8. Datos representados como media \pm S.E.M., *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 en comparación con el grupo naïve. #P<0,05; ##P<0,01; ###P<0,001 comparando con el grupo control C57BL/6. +P<0,05; ++P<0,01; +++P<0,001 comparando los ratones condicionales machos y hembras entre sí. ANOVA (una vía) Test de Sidak para comparar cada animal artrítico con su respectivo naïve y test de Tukey para comparar los animales artríticos o sanos de los distintos grupos entre sí.

En las figura 67 y 68, están representados los niveles de CXCL-1 y MMP-3, en ambos casos se observa como los valores de estos mediadores inflamatorios están elevados en los ratones control, con respecto al grupo sano tanto en patas traseras como en delanteras. Sin embargo, de nuevo estas diferencias no se observan entre los ratones condicionales. En el caso concreto de la citocina CXCL-1, cuando analizamos las patas delanteras de los ratones condicionales, separando entre los ratones macho y hembra, sí que apreciamos como los ratones macho parten de niveles más inferiores de esta

4. Resultados

4.2 Estudio de la deficiencia de HO-1 en la artritis experimental

citocina y que al inducir la artritis, estos valores aumentan significativamente, pero siguen siendo inferiores a los niveles observados en el grupo control. Contrariamente, los ratones hembra, poseen niveles superiores de CXCL-1, y además estas diferencias son significativas si lo comparamos con los grupos de ratones condicionales macho en las patas delanteras.

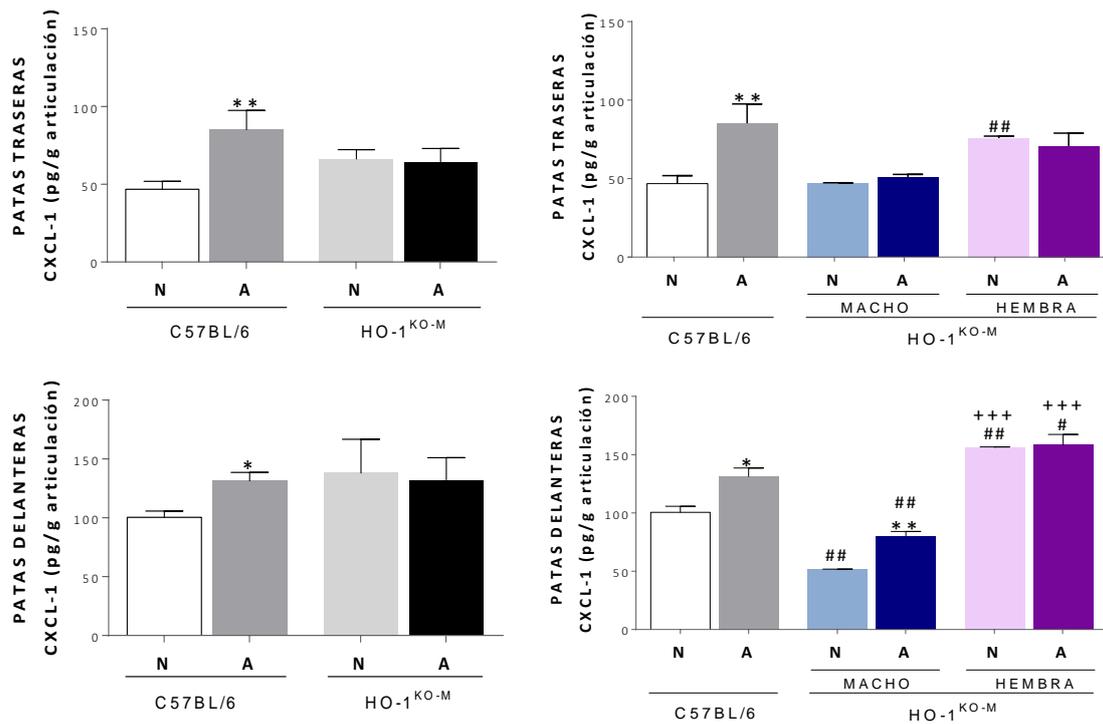


Figura 67. Niveles de CXCL-1 en homogeneizado de patas de ratón. C57BL/6: control, HO-1^{KO-M}: condicional, N: naïve, A: artrítico n=8. Datos representados como media \pm S.E.M., *P<0,05; **P<0,01; en comparación con el grupo naïve. #P<0,05; ##P<0,01; comparando con el grupo control C57BL/6. +++P<0,001 en comparación con el grupo HO-1^{KO-M} del sexo opuesto. ANOVA (una vía) Test de Sidak para comparar cada animal artrítico con su respectivo naïve y test de Tukey para comparar los animales artríticos o sanos de los distintos grupos entre sí.

En el caso de la **MMP-3**, los ratones condicionales artríticos presentan niveles significativamente más bajos que los ratones control tanto en pata trasera como en delantera, sin observarse diferencias entre machos o hembras (figura 68). Como hemos visto anteriormente (ver apartado Resultados 4.2.1.4) esta proteasa, está muy implicada en la degradación del tejido conectivo durante el proceso artrítico.

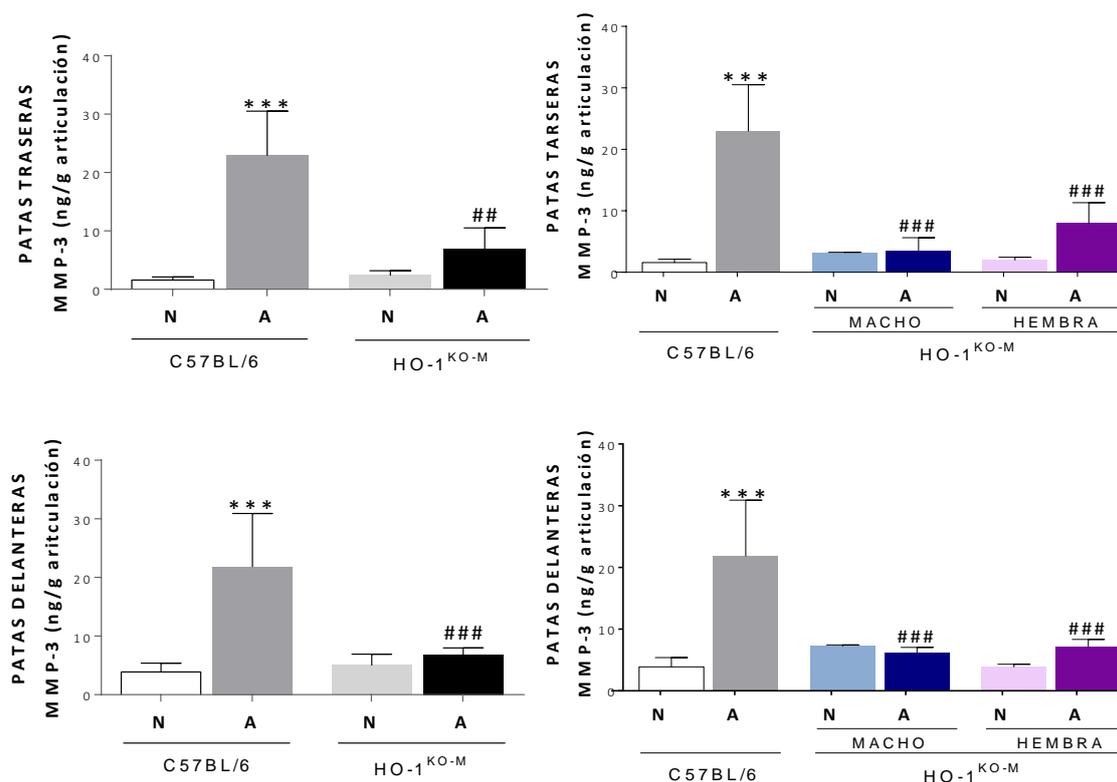


Figura 68. Niveles de MMP-3 en homogeneizado de patas de ratón. C57BL/6: control, HO-1^{KO-M}: condicional, N: naïve, A: artrítico, n=8. Datos representados como media ± S.E.M., *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 en comparación con el grupo naïve. #P<0,05; ##P<0,01; ###P<0,001 en comparación con el grupo control C57BL/6. ANOVA (una vía) Test de Sidak para comparar cada animal artrítico con su respectivo naïve y test de Tukey para comparar los animales artríticos o sanos de los distintos grupos entre sí.

Por otro lado, los niveles de **TNF α** , están incrementados en los ratones condicionales artríticos, observándose importantes diferencias en las patas delanteras de estos animales con respecto al grupo artrítico control. Estas diferencias son patentes tanto en machos como en hembras condicionales. Y además, las diferencias también son notables si comparamos machos y hembras entre sí, siendo en éstas los niveles superiores (Figura 69).

Los valores de **PGE₂** en pata trasera no presentan diferencias significativas entre los grupos, pero en pata delantera, las hembras condicionales poseen niveles inferiores a los del grupo control. Ambos mediadores están representados en la figura 69.

4. Resultados

4.2 Estudio de la deficiencia de HO-1 en la artritis experimental

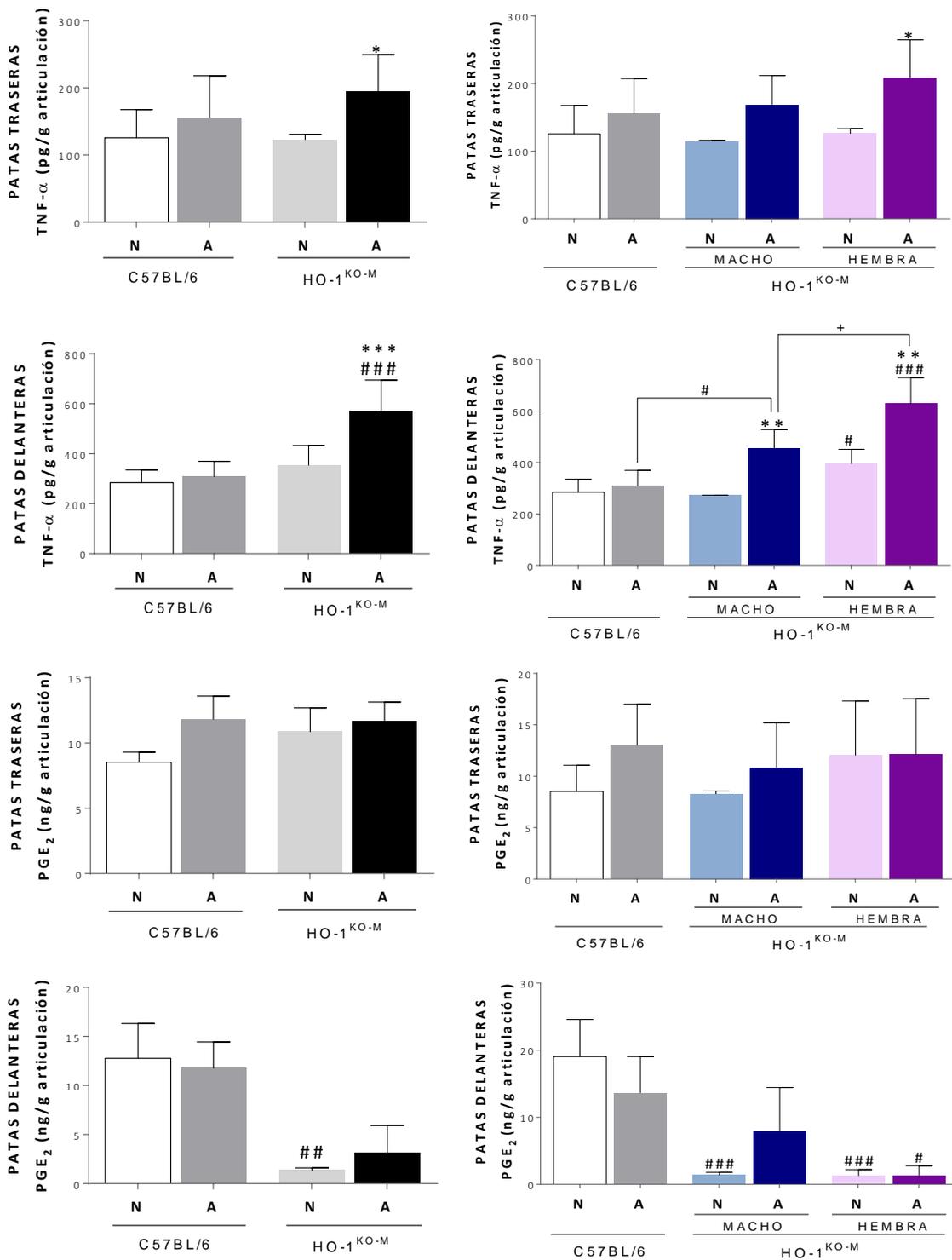


Figura 69. Niveles de TNF α y PGE₂ en homogeneizado de patas de ratón. C57BL/6: control, HO-1^{KO-M}: condicional, N: naïve, A: artrítico, n=8. Datos representados como media \pm S.E.M., *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 en comparación con el grupo naïve. #P<0,05; ##P<0,01; ###P<0,001 en comparación con el grupo control C57BL/6. +P<0,05 en comparación con el grupo HO-1^{KO-M} del sexo opuesto. ANOVA (una vía) Test de Sidak para comparar cada animal artrítico con su respectivo naïve y test de Tukey para comparar los animales artríticos o sanos de los distintos grupos entre sí.

4.2.2.3.4 Estudio del estrés oxidativo en células de médula ósea

Como se menciona anteriormente, de las patas traseras de los animales sanos y artríticos, se extrajeron células de la médula ósea para analizar los niveles de estrés oxidativo de los distintos grupos de ratones tras estimular las células con dihidrorrodamina 1,2,3 (DHR) y PMA (ver Material y métodos, apartado 3.2.2 b). En la figura 70, se muestran los valores de estrés oxidativo analizados por citometría de flujo. Como se puede observar, se aprecian diferencias significativas entre los grupos sanos y artríticos de los ratones control, pero no de los ratones condicionales. Sin embargo, sí que se observa, como los ratones condicionales, al separarlos por sexos, el grupo de las hembras muestra niveles mayores de estrés oxidativo comparado con los machos.

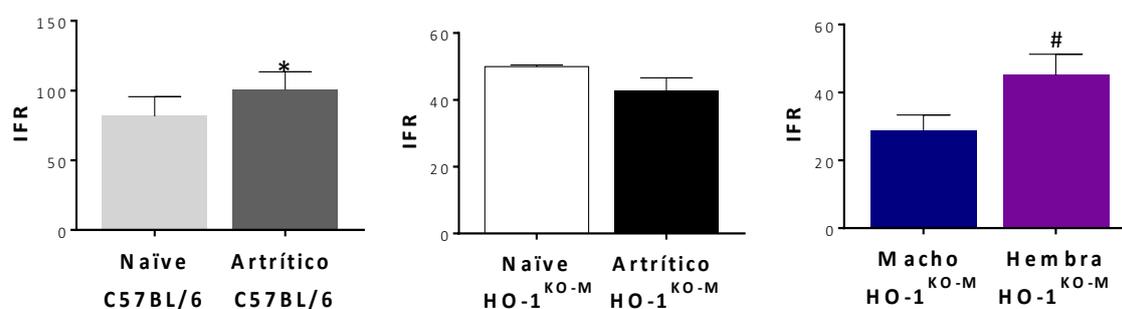


Figura 70. Valores de estrés oxidativo analizados en células extraídas de médula ósea de ratón. IFR (intensidad de fluorescencia relativa) Valores representados como media \pm SD. * $P < 0,05$; comparado con el grupo naïve, # $P < 0,05$; comparado con el grupo HO-1^{KO-M} macho. Prueba T de Student despareada (two tailed).

Es probable que muchos de estos parámetros analizados, muestren valores inferiores en el grupo de los ratones condicionales macho, debido a que las muestras se obtuvieron cuando la artritis en este grupo ya había empezado a remitir. Esta remisión afecta a los niveles de mediadores estudiados, principalmente en homogeneizado de pata y en las células de la médula ya que se valoran parámetros que varían rápidamente en poco tiempo.

4.2.2.3.5 Estudio histológico

Con las patas traseras de los ratones de los distintos grupos, sacrificados a día 10, realizamos el estudio histológico. Se utilizaron tinciones de hematoxilina/eosina y de

4. Resultados

4.2 Estudio de la deficiencia de HO-1 en la artritis experimental

safranina *O/fast green* para analizar los distintos indicadores del daño en la articulación del tobillo.

Los ratones naïve, presentan una estructura articular perfectamente sana, mientras que los ratones artríticos, tanto control C57BL/6 como condicionales HO-1^{KO-M}, muestran grandes cantidades de infiltrado y exudado celular en la cavidad articular (Figura 71).

Por el contrario, no se observa, ni erosión del cartílago ni una afectación de los condrocitos significativa en ninguno de los grupos artríticos, como es habitual en este modelo de artritis.

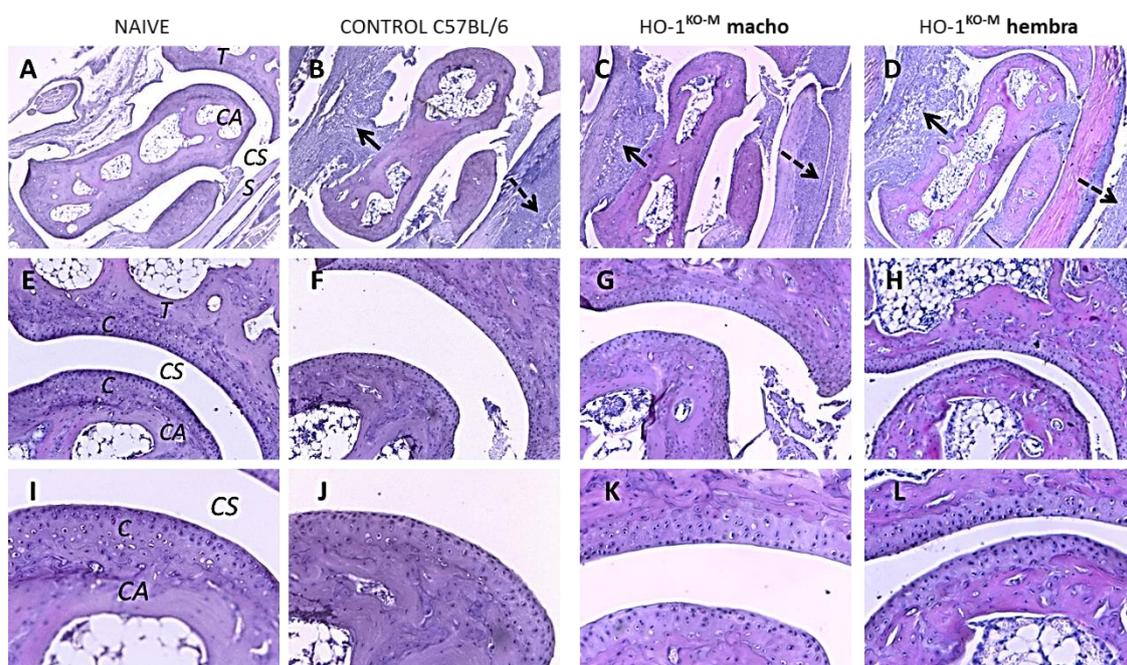


Figura 71. Secciones tisulares frontales de tobillo teñidas con hematoxilina-eosina. A día 10 del proceso artrítico. Naïve: animal sano, el resto, animales artríticos. B, C, D = Marcada infiltración sinovial (flecha continua) y exudado sinovial (flecha punteada). T = tibia, CA = calcáneo, C = cartílago, S = membrana sinovial, CS = cavidad sinovial. A-D: vista 40x, E-H: vista 100x e I-L: vista 200x.

Uno de los procesos característicos de la artritis, es la pérdida del proteoglicano del cartílago que recubre la articulación. La depleción de esta glicoproteína, puede analizarse mediante tinciones histológicas con safranina *O/fast green*. En las imágenes de la figura 72, se puede observar como en los animales artríticos, la primera capa del cartílago, tiene una menor coloración, esto se debe a que ha perdido parte del proteoglicano que lo forma.

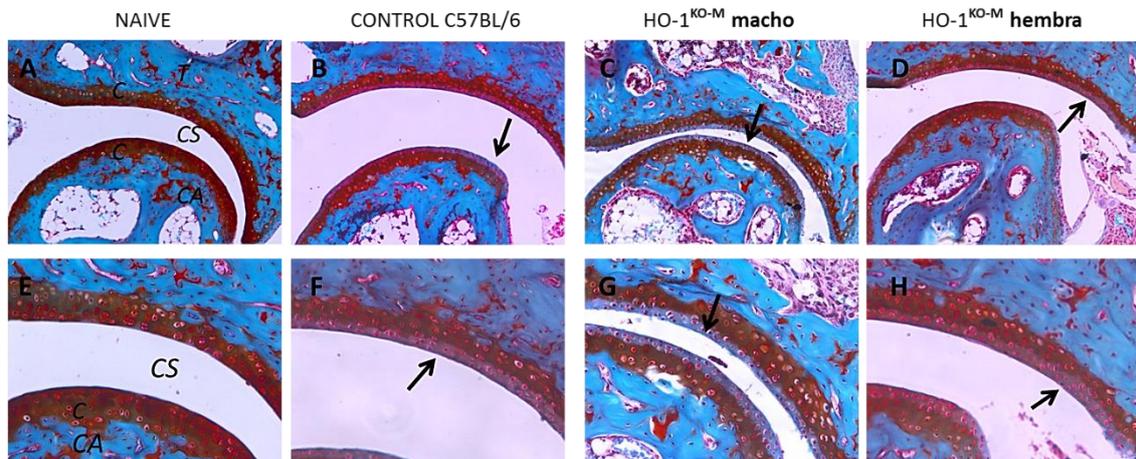


Figura 72. Secciones tisulares frontales de tobillo teñidas con safranina O/fast green. A día 10 del proceso artrítico. Naive: animal sano, el resto, animales artríticos. B, C, D, F, G y H Marcada depleción de proteoglicano (flecha continua). CA= calcáneo, C = cartilago, CS = cavidad sinovial. A-D: vista 100x, E-H: vista 200x

En la figura 73, donde se analizan estadísticamente todos los parámetros histológicos, no se observan diferencias significativas entre los distintos grupos artríticos entre sí, aunque tanto el infiltrado, como el exudado celular y la depleción de proteoglicano están muy marcados en este modelo artrítico.

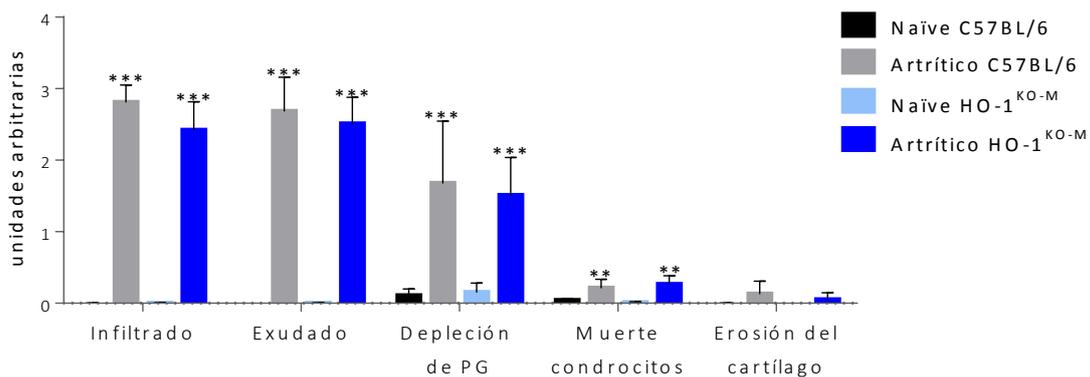


Figura 73. Evaluación histológica de tobillo a día 10 del proceso artrítico. Todos los parámetros fueron evaluados utilizando una escala de 0-3. Valores representados como media \pm S.E.M, $n=4-10$. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, comparando cada grupo de animales artríticos con su respectivo grupo de animales no artríticos mediante análisis de ANOVA (una vía) seguido del test de Sidak de múltiple comparación.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos en la puntuación macroscópica (Figura 63), advertimos que histológicamente las diferencias entre los grupos no son tan marcadas como se observaban macroscópicamente. Debido a que el estudio histológico revela que la infiltración de células inflamatorias en la articulación y la afectación del proteoglicano del cartílago, son muy similares entre el grupo control y los ratones condicionales tanto machos como hembras, es muy probable que la diferencia que presentaban macroscópicamente el grupo de los ratones condicionales hembras con el resto, se debiera principalmente al edema producido en la articulación del tobillo.

Cabe destacar, que en las tinciones con safranina *O/fast green*, los cortes histológicos de ratones condicionales artríticos, tanto machos como hembras, presentaban la agrupación celular conocida como osteofito, situada cerca de la tibia. Estas células que conforman zonas de crecimiento anómalo de hueso, aparecen cuando existe mucha infiltración y destrucción ósea. Los osteofitos no se observaron en las secciones tisulares del grupo control, ya que no es habitual en este modelo de artritis tan agudo y tan rápido que se produzca la formación de nuevo hueso (Figura 74).

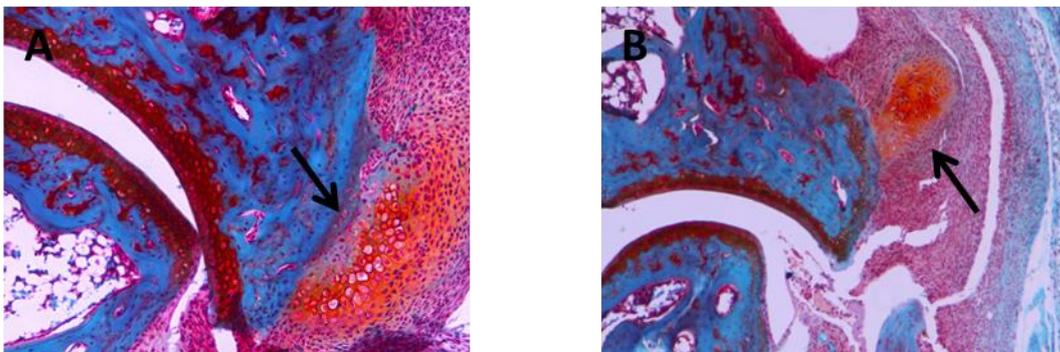


Figura 74. Imágenes de osteofitos en ratones condicionales HO-1^{KO-M}. Fotografías de cortes histológicos de ratones condicionales a día 10 del proceso artrítico teñidos con safranina *O/fast green*. Señalizada la formación de osteofitos. A: vista 100x, B: vista 40x.

4.2.2.3.6 Estudio inmunohistoquímico de la expresión de HO-1

Para estudiar las diferencias tisulares en la expresión de HO-1, analizamos los cortes histológicos de los tobillos mediante inmunohistoquímica. Esta técnica nos permite visualizar los condrocitos que expresan HO-1 “in situ” en las secciones de la articulación del tobillo.

En la figura 75, podemos observar los condrocitos del cartílago que envuelven la tibia y el calcáneo. Mediante la técnica de inmunohistoquímica, estas células se tiñen de color marrón cuando expresan HO-1. Los ratones artríticos, tanto del grupo control como los condicionales, mostraban expresión de esta enzima en los condrocitos, sin observarse diferencias significativas entre ellos. Vemos por tanto, que la condición de que los ratones HO-1^{KO-M} no expresen HO-1 en las células provenientes de la línea mieloide, no afecta a la expresión de esa enzima en otros tipos celulares.

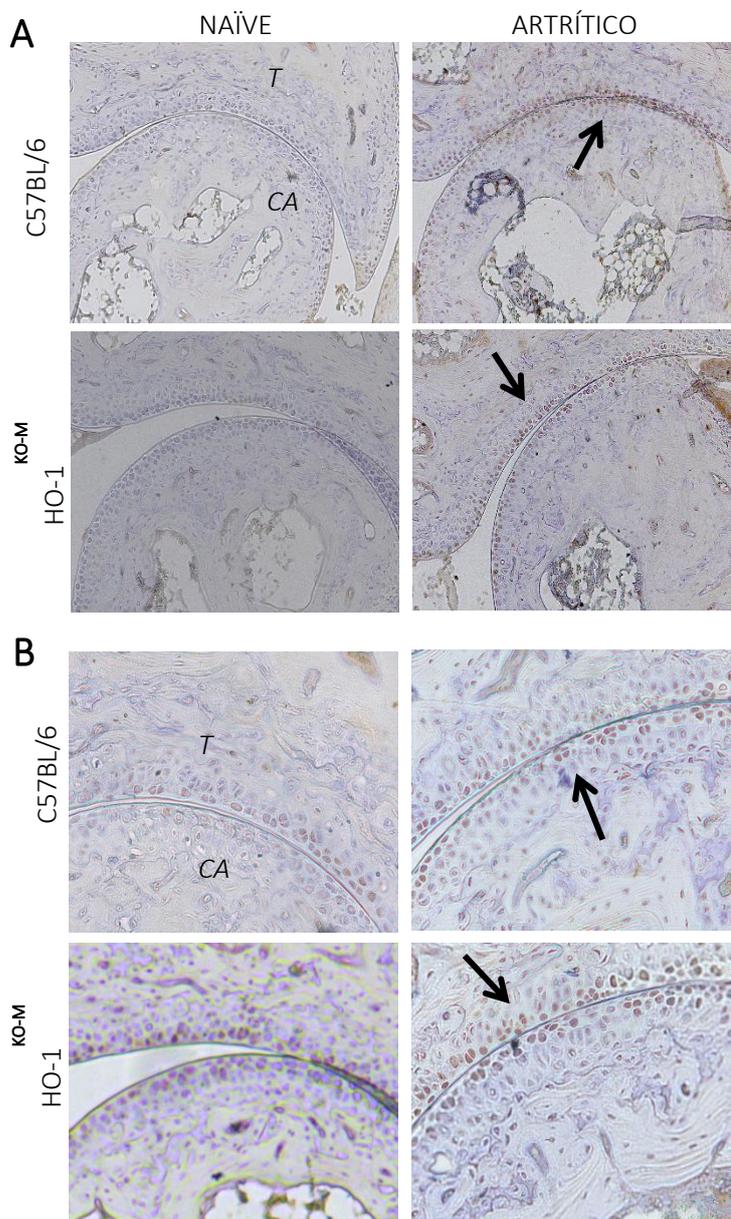


Figura 75. Secciones tisulares frontales de tobillo teñidas por inmunohistoquímica. A día 10 del proceso artrítico. Naïve: animal sano. Marcada la expresión de HO-1 en los condrocitos del cartílago, que se distingue por una tinción marrón en estas células. Vemos como los animales artríticos expresan esta enzima. CA= calcáneo, T= tibia. A: Vista 100x y B: Vista 200x

4.2.2.3.7 Diferenciación de células de médula ósea a osteoclastos

Debido a las zonas de crecimiento anómalo u osteofitos que observamos en los ratones condicionales cuando realizamos las tinciones con safranina *O/fast green*, decidimos diferenciar células de médula ósea de estos ratones a osteoclastos, para ver si se producían diferencias importantes entre los ratones HO-1^{KO-M} y los controles, ya que estas células participan activamente en el remodelado óseo.

Los osteoclastos se forman por la fusión de células de la familia monocito/macrófago que se diferencian a partir de precursores hematopoyéticos en un proceso dirigido por distintas citocinas. Son células que participan en la degradación del hueso, y están muy implicadas en el proceso artrítico.

Tras diferenciar las células de la médula ósea a osteoclastos estimulándolas con RANKL y M-CSF, realizamos la tinción de TRAP-5b (ver Material y métodos, apartado 3.2.2 d).

En la figura 76, tenemos las imágenes de las células diferenciadas a osteoclastos, de los distintos grupos de ratones. Los osteoclastos se caracterizan por ser células de gran tamaño y polinucleadas, además poseen una porción de su membrana "arrugada", en forma de cepillo, rodeada de un citoplasma libre de orgánulos llamada "zona clara", con la que se adhiere a la superficie del hueso.

En estas fotografías podemos observar como los animales artríticos presentan mayor número de osteoclastos que los ratones sanos, pero además hay una gran diferencia entre los controles y los ratones condicionales, ya que estos últimos tienen mayor cantidad de estas células, y además de mayor tamaño que los controles. Dentro de los ratones condicionales, las hembras, destacan por tener osteoclastos más grandes y abundantes que los machos.

Por tanto, la deficiencia de HO-1 en los macrófagos también influye en la formación de osteoclastos y por tanto en el remodelado óseo de las articulaciones artríticas.

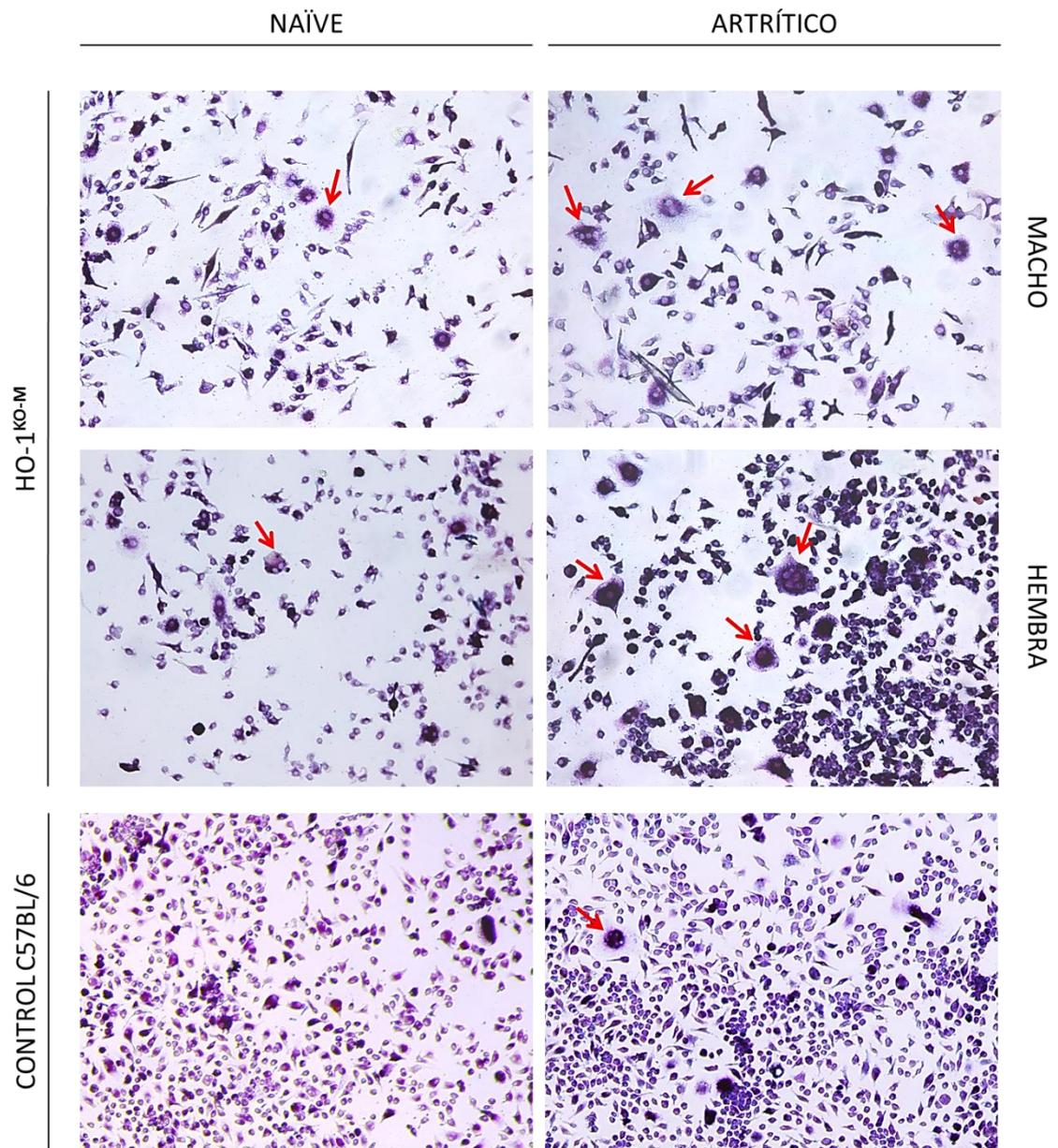


Figura 76, Células de médula ósea diferenciadas a osteoclastos y teñidas con TRAP-5b. Señalados los osteoclastos y/o sus precursores. Ampliación 100x

Discusión

5.1. ESTUDIO DEL MODELO DE ARTRITIS POR TRANSFERENCIA DE SUERO K/BxN

La respuesta inflamatoria y autoinmune inducida por la transferencia de suero K/BxN está mediada por anticuerpos IgG1 (Matsumoto et al. 2002) y reproduce varias características de la fase efectora de la AR. Este modelo tiene la ventaja de que puede ser utilizado en numerosas cepas de ratón. Además, en los ratones más utilizados en modelos transgénicos (C57BL/6) la incidencia de la artritis es del 100% (Monach et al, 2008). En este trabajo hemos analizado las distintas fases de la evolución del proceso artrítico que determina la administración del suero K/BxN. Así, se han comparado las características del modelo original con las que presentan el modelo crónico y el de resolución. En el modelo original (control) la enfermedad presenta un máximo el día 10 desde la primera inmunización, y va disminuyendo progresivamente hasta la resolución. En el caso del grupo resolución, después del máximo a los 10 días, la artritis disminuye de forma gradual sin apreciarse prácticamente inflamación o deformación articular al final del experimento (día 30) (Matzelle et al, 2012). No obstante, se ha sugerido que la resolución de la inflamación no afectaría por igual a todos los tejidos y podría mantenerse una hiperalgesia articular (Christianson et al. 2010). Se ha conseguido cronificar el proceso artrítico realizando tres reinmunizaciones con suero de ratones K/BxN en los días 9, 16 y 23. De esta manera, las manifestaciones clínicas de la artritis se mantienen estables. Con la cronificación del proceso, la inflamación tiene una tendencia a disminuir mientras que la deformación de las patas traseras va aumentando. El estudio histológico de la articulación en los diferentes grupos experimentales ha confirmado los resultados macroscópicos, destacando la presencia de infiltración leucocitaria, depleción de proteoglicanos, erosión del cartílago y pérdida de condrocitos a día 10 y durante la fase crónica (día 30) de la artritis.

El proceso inflamatorio articular inducido por la transferencia de suero K/BxN depende de la migración leucocitaria (Wipke y Allen 2001; Solomon, 2005) y la producción de diferentes mediadores inflamatorios. En nuestro estudio se ha observado que el aumento de los niveles de mediadores inflamatorios que se origina en este proceso es más pronunciado en las patas traseras de los ratones. Las citocinas inflamatorias tienen un importante papel en la AR y en la artritis experimental. En este modelo, se han

5. Discusión

observado cambios significativos en los niveles de IL-1 β . Esta citocina está implicada en la respuesta inflamatoria inducida por la administración de suero K/BxN (Ji et al. 2002). Nuestros resultados demuestran que IL-1 β aumenta significativamente en las patas traseras en la primera fase de la artritis, mientras que con la evolución hacia la resolución o la cronicidad, sus niveles disminuyen, lo que sugiere que dicha citocina participa principalmente en la fase de inducción del proceso. En esta fase también participaría otra citocina de gran importancia en la AR, TNF α , que además contribuiría a la fase crónica del proceso.

La producción de quimiocinas como CXCL-1 determina la migración leucocitaria a las articulaciones. En el modelo clásico de artritis por transferencia de suero K/BxN, esta quimiocina se sobre-expresa en la articulación y fluido sinovial de forma paralela a la progresión de la artritis (Jacobs et al, 2010). En este trabajo se ha observado que los niveles de CXCL-1 aumentan en las patas delanteras y traseras durante la fase de inducción de la artritis, mientras que en la fase de resolución los niveles de esta quimiocina disminuyeron de forma significativa. En la fase crónica, los niveles de CXCL-1 fueron menores que los del grupo control, aunque solamente fue significativo en las patas traseras. Por tanto, nuestros resultados sugieren que esta quimiocina tendría un papel más importante en la inducción del proceso inflamatorio que en su cronificación. De forma similar, los niveles de otro importante mediador inflamatorio, PGE₂, aumentaron de forma significativa en las patas traseras durante la inducción de la artritis, disminuyendo en los grupos resolución y crónico hasta niveles similares a los del grupo naïve, lo que sugiere que participa en la inducción pero no en el mantenimiento del proceso inflamatorio inducido por transferencia de suero K/BxN.

Durante los procesos inflamatorios se pueden producir elevadas concentraciones de ROS que contribuirían a la degradación de los tejidos (Ma 2010, Valko et al. 2007). No obstante, los ROS también tienen un papel fisiológico como mediadores de la señalización intercelular e intracelular. En determinadas circunstancias podrían incluso tener un posible efecto antiinflamatorio (Teissier et al. 2004) y, varios estudios en animales transgénicos han observado que la deficiencia en componentes de NADPH oxidasa aumenta la susceptibilidad a la artritis y otros procesos autoinmunes (revisado

en Holmdahl et al. 2016). En los resultados obtenidos se observó un aumento en los niveles de estrés oxidativo en el grupo control (a día 10) y también en el grupo resolución (a día 30) respecto a los correspondientes ratones naïve, mientras que en los ratones del grupo crónico no se detectaron variaciones. Estos resultados sugieren un papel dual del estrés oxidativo, que podría participar en las fases de inducción y de resolución de la artritis.

Por tanto, este estudio del modelo de artritis inducida por transferencia de suero K/BxN nos ha permitido determinar las diferentes fases del proceso y los mediadores que participan en ellas. Dicho modelo experimental puede utilizarse con ratones transgénicos, ya sea siguiendo el protocolo original o la modificación que hemos realizado para incluir la fase tardía del proceso.

5.2. ESTUDIO DE LAS CONSECUENCIAS DE LA DEFICIENCIA DE HO-1 EN LA INFLAMACIÓN EXPERIMENTAL

5.2.1 RATONES HO-1 *KNOCKOUT* (HO-1^{-/-} Y HO-1^{+/-})

ARTRITIS POR TRANSFERENCIA DE SUERO K/BxN

La vía HO-1 regula diferentes aspectos de las respuestas inmune e inflamatoria. Las evidencias existentes indican que la inducción de HO-1 es parte de un mecanismo para restaurar la homeostasis celular y reparar el tejido en numerosos procesos inflamatorios agudos y crónicos. La deficiencia en HO-1 resultaría en una menor protección y podría facilitar la respuesta inflamatoria. Algunos estudios anteriores han demostrado que esta deficiencia favorece la producción de citocinas Th1 (Kapturczak et al. 2004) y la inhibición de la actividad de las células Treg (George et al. 2008). Nuestros resultados indican que la inducción de la artritis por transferencia de suero K/BxN en ratones HO-1^{+/-} y en menor medida en ratones HO-1^{-/-}, origina un proceso inflamatorio de mayor intensidad que el observado en los ratones HO-1^{+/+}, en cuanto a la puntuación macroscópica, las alteraciones histológicas y los niveles de mediadores inflamatorios. Se ha descrito que el modelo de transferencia de suero K/BxN depende de la actividad de los macrófagos y especialmente de los neutrófilos (Wipke y Allen 2001, Solomon et al.

5. Discusión

2005). En este estudio, se ha demostrado que la deficiencia en HO-1 produce un aumento de la respuesta inflamatoria a nivel articular, que podría relacionarse con un aumento en la migración de los neutrófilos dependiente de la producción de quimiocinas como CXCL-1.

Por otro lado, los niveles articulares de los mediadores inflamatorios IL-6 y MMP-3 aumentan significativamente en ratones HO-1^{+/-} y HO-1^{-/-} respecto a los ratones normales. Sin embargo, hay diferencias entre los ratones heterocigotos y homocigotos en diversos mediadores. Dado que en la artritis por transferencia de suero K/BxN la IL-1 β tiene un importante papel (Ji et al. 2002), la falta de efectos sobre esta citocina puede contribuir a la menor respuesta artrítica en ratones HO-1^{-/-} comparados con los ratones HO-1^{+/-}. También hemos demostrado que la deficiencia en HO-1 produce un aumento en los niveles séricos de MCP-1 en comparación con los animales HO-1^{+/+}, lo que confirma estudios previos en otros modelos experimentales que relacionan los efectos protectores de HO-1 con su capacidad para evitar la sobre-regulación de MCP-1 (Pittock et al. 2005). Los resultados obtenidos indican que la ausencia de HO-1 altera la homeostasis leucocitaria tanto en animales sanos como en artríticos. Estos efectos podrían depender de la modificación de los niveles de quimiocinas que regulan la movilización de los leucocitos (Combadiere et al. 2008). La sobre-regulación de ICAM-1 en diferentes células articulares contribuye a la progresión de la AR (Szekanecz et al. 1994) y de la artritis por transferencia de suero K/BxN (Watts et al. 2005). Nuestros resultados confirman datos obtenidos en otros modelos que indican que HO-1 inhibe la expresión de moléculas de adhesión (Vachharajani et al. 2000) y sugieren que, durante la fase efectora de la artritis, la deficiencia en HO-1 determina la activación endotelial y la alteración de la fibrinólisis. La deficiencia en HO-1 también modificó los niveles séricos de RANKL y de osteocalcina, lo que sugiere que puede afectar negativamente al metabolismo óseo durante la artritis experimental.

En este modelo de artritis, el proceso inflamatorio en ratones HO-1^{-/-} fue menos intenso que en ratones HO-1^{+/-}. Se ha de señalar que los ratones heterocigotos representan un estado más fisiológico que los ratones homocigotos, que desarrollan con el tiempo cambios indicativos de un estado inflamatorio crónico y tienen una mayor mortalidad

(Poss y Tonegawa 1997b, Kapturczak et al. 2004, George et al. 2008). La alteración de la homeostasis en estos animales puede modificar la respuesta al suero K/BxN. Una alteración en la producción de quimiocinas y citocinas que regulan la movilización leucocitaria, la activación y la infiltración podría producir alteraciones inflamatorias sistémicas en los ratones HO-1^{-/-} que limitarían la respuesta inflamatoria articular. De esta forma, la presencia en estos animales de elevados niveles séricos de MCP-1 y PAI-1 podría determinar una disfunción vascular y el reclutamiento de células inflamatorias, así como un estado de pro-coagulación (Pittock et al. 2005). Por otro lado, existe la posibilidad de que la ausencia de HO-1 origine mecanismos compensatorios parciales frente al estrés pero que la falta de solamente un alelo de HO-1 no sea suficiente para iniciar dicha respuesta. Además, se ha puesto de manifiesto en el hígado de los ratones heterocigotos una menor expresión de genes antioxidantes como ferritina y GSTA-1, respecto a los ratones homocigotos, lo que sugiere una menor defensa antioxidante sistémica en los ratones HO-1^{+/-} que, unida a la deficiencia parcial de HO-1, podría determinar una mayor intensidad en el desarrollo del proceso artrítico en estos animales.

5.2.2 RATONES HO-1 *KNOCKOUT* CONDICIONAL EN LA LÍNEA MIELOIDE

MODELO DE BOLSA DE AIRE

Como un estudio previo, caracterizamos el modelo MAP en ratones C57BL/6 utilizando zimosán como estímulo inflamatorio. Ello nos permitió determinar la evolución temporal de importantes mediadores inflamatorios como IL-1 β , TNF α , CXCL-1 y PGE₂ para seleccionar el tiempo más adecuado para su utilización posterior en ratones HO-1^{KO-M}. Dicho tiempo fue de 18 horas desde la administración de zimosán, adecuado para detectar unos niveles elevados de mediadores en el exudado y de HO-1 en las células que migran. Dicho modelo se utilizó para estudiar la respuesta inflamatoria aguda en ratones HO-1^{KO-M}. De esta forma, observamos que la deficiencia de HO-1 en células mieloides potenció de forma significativa el aumento de la migración leucocitaria al exudado de la bolsa inducida por zimosán, así como los niveles de los mediadores inflamatorios IL-1 β , TNF α , PGE₂ y MMP-3, aunque no afectó significativamente los niveles de CXCL-1. Además, los resultados sugieren la presencia de una reacción

5. Discusión

inflamatoria sistémica en estos ratones, tanto en presencia como en ausencia de zimosán. Las células mieloides desempeñan un importante papel en las respuestas inmunes innata y adaptativa (Galli et al. 2011). Se ha señalado que CO producido por HO-1 o administrado exógenamente, facilita la diferenciación de células mieloides progenitoras a macrófagos (Wegiel et al. 2014) así como las funciones de estas células incluyendo su participación en la resolución de la inflamación (Chiang et al. 2013). Los resultados obtenidos con los ratones HO-1^{KO-M} en el modelo de bolsa de aire apoyan la hipótesis de que la presencia de HO-1 en las células mieloides tiene un papel antiinflamatorio en la inflamación aguda.

ARTRITIS POR TRANSFERENCIA DE SUERO K/BxN

En la AR se producen numerosas quimiocinas que determinan la migración de células como linfocitos T, monocitos y neutrófilos (Bruhl et al. 2001) hacia la cavidad sinovial y los tejidos articulares (Koch et al. 1992). Se acepta que los monocitos se diferencian en macrófagos tisulares que producen niveles elevados de mediadores inflamatorios y enzimas degradativas, que desempeñan un importante papel en la degradación articular. Una alteración de su diferenciación o función llevaría a una prolongación de la respuesta inflamatoria y se relaciona con la patogénesis de las enfermedades autoinmunes (Solomon et al. 2005). Algunos estudios se han centrado en el posible papel de HO-1 en células mieloides. Así, se ha demostrado en macrófagos que HO-1 no es necesaria para la activación de los factores de transcripción NF- κ B o AP-1 y la síntesis de citocinas inflamatorias inducidas por la activación de receptores TLR3 o TLR4, pero es un importante mediador de la inmunidad innata al regular la producción de IFN- β , de forma que su deficiencia origina una activación de las células presentadoras de antígeno y de la infiltración de células Th17 (Tzima et al. 2009).

En el modelo de artritis por transferencia de suero K/BxN, contrariamente a lo esperado, los ratones HO-1^{KO-M} no presentan una artritis más agresiva que los ratones control. Se observó además una diferencia de comportamiento entre machos y hembras, de forma que el desarrollo de la artritis es más lento en las hembras e inferior en la puntuación macroscópica respecto a los ratones macho y a los controles. Además, las alteraciones histológicas fueron similares a los controles, tanto en ratones macho

5. Discusión

como en las hembras, con la excepción de la presencia de osteofitos en todos los ratones HO-1^{KO-M} artríticos, indicando la presencia de un proceso de remodelación ósea en estos animales.

La evolución del proceso inflamatorio articular está retardada en los ratones HO-1^{KO-M} hembra respecto a los machos, lo que vendría reflejado por los niveles superiores de varios mediadores, mientras que en los ratones macho ya estaría en fase de disminución. Así, los niveles de TNF α están aumentados en los ratones HO-1^{KO-M} artríticos, especialmente en las hembras, respecto a los controles. También los ratones naïve hembra tienen unos niveles más altos de IL-1 β y de CXCL-1 respecto a los machos y a los controles, y la inducción de la artritis no ocasiona un aumento significativo. Estos resultados sugieren unas diferencias de respuesta asociadas al sexo, que deberán confirmarse en estudios realizados con un mayor número de animales.

Por otro lado, en las células de la médula ósea, se ha observado una menor capacidad de producción de estrés oxidativo en los ratones HO-1^{KO-M} frente a los ratones control, lo que confirma resultados publicados recientemente (Konrad et al. 2016). También es interesante señalar que en los ratones HO-1^{KO-M} aparece una mayor diferenciación de células de la médula ósea a osteoclastos, especialmente en las hembras, lo que podría favorecer la degradación ósea y estimular el proceso de remodelado que se ha observado en el estudio histológico de la articulación artrítica. En este modelo experimental hemos observado una mayor producción de TNF α y de estrés oxidativo en los ratones HO-1^{KO-M} hembra, que podría favorecer el proceso de osteoclastogénesis (Boyce et al. 2006). Nuestros resultados apoyarían un posible papel inhibitorio de la osteoclastogénesis para HO-1, como se ha sugerido en otros modelos experimentales (Zwerina et al. 2005).

El conjunto de los datos obtenidos en el presente trabajo con ratones *knockout* total y *knockout* condicional sugieren que la HO-1 no mieloide tendría un papel más importante que la HO-1 mieloide en la regulación de la artritis experimental inducida por la administración de suero K/BxN.

Conclusiones

6. Conclusiones

- 1.** Se ha caracterizado el modelo de artritis por transferencia de suero K/BxN para conocer la evolución del proceso y los mediadores implicados. Este estudio ha determinado que en la fase crónica de la artritis se mantienen los niveles de TNF α y CXCL-1 y predomina la deformación frente a la inflamación en las articulaciones afectadas.
- 2.** La HO-1 contribuye al control de la fase efectora de la artritis. La delección de HO-1 determina un aumento de los niveles de mediadores inflamatorios como IL-6 y MMP-3 y un empeoramiento en el modelo de artritis inducida por transferencia de suero K/BxN. La heterocigosis provoca una intensa respuesta inflamatoria articular que estaría relacionada con un aumento de los niveles de CXCL-1 y de la migración leucocitaria, mientras que la homocigosis determina una mayor respuesta inflamatoria sistémica.
- 3.** La HO-1 mieloide tiene un papel antiinflamatorio en la respuesta aguda inducida por zimosán en la bolsa de aire en ratón, observándose en los ratones *knockout* condicionales un aumento de la migración leucocitaria y de los niveles de mediadores como IL-1 β , TNF α , MMP-3 y PGE $_2$.
- 4.-** La HO-1 mieloide participa en el control del remodelado óseo afectando a la osteoclastogénesis y la formación de osteofitos en el modelo de artritis inducida por transferencia de suero K/BxN, aunque su papel en la evolución del proceso artrítico sería de menor relevancia que el de la HO-1 no mieloide.

Bibliografía

7. Bibliografía

- Agah, R., Frenkel, P. A., French, B. A., Michael, L. H., Overbeek, P. A. y Schneider, M. D. (1997). "Gene recombination in postmitotic cells. Targeted expression of Cre recombinase provokes cardiac-restricted, site-specific rearrangement in adult ventricular muscle in vivo." J Clin Invest **100**(1): 169-179.
- Alam, J. y J. L. Cook (2007). "How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene?" Am J Respir Cell Mol Biol **36**(2): 166-174.
- Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A. M. y Cook, J. L. (1999). "Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene." J Biol Chem **274**(37): 26071-26078.
- Ansel, K. M., Djuretic, I., Tanasa, B. y Rao, A. (2006). "Regulation of Th2 differentiation y Il4 locus accessibility." Annu Rev Immunol **24**: 607-656.
- Asquith, D. L., Miller, A. M., McInnes, I. B. y Liew, F. Y. (2009). "Animal models of rheumatoid arthritis." Eur J Immunol **39**(8): 2040-2044.
- Ayer, A., Zarjou, A., Agarwal, A. y Stocker, R. (2016). "Heme Oxygenases in Cardiovascular Health y Disease." Physiol Rev **96**(4): 1449-1508.
- Backlund, J., Li, C., Jansson, E., Carlsen, S., Merky, P., Nandakumar, K. S. y Holmdahl, R. (2013). "C57BL/6 mice need MHC class II Aq to develop collagen-induced arthritis dependent on autoreactive T cells." Ann Rheum Dis **72**(7): 1225-1232.
- Balla, J., Vercellotti, G. M., Jeney, V. Yachie, A., Varga, Z., Eaton, J. W. y Balla, G. (2005). "Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury." Mol Nutr Food Res **49**(11): 1030-1043.
- Baranano, D. E., Wolosker, H., Bae, B. I., Barrow, R. K., Snyder, S. H., and Ferris, C. D. (2000). "A mammalian iron ATPase induced by iron." J Biol Chem **275**(20): 15166-15173.
- Basuroy, S., Bhattacharya, S., Tcheranova, D., Qu, Y., Regan, R. F., Leffler, C. W. y Parfenova, H. (2006). "HO-2 provides endogenous protection against oxidative stress and apoptosis caused by TNF-alpha in cerebral vascular endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **291**(5): C897-908.
- Bergeron, M., Ferriero, D. M. y Sharp, F. R. (1998). "Developmental expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: an immunocytochemical study." Brain Res Dev Brain Res **105**(2): 181-194.
- Bettelli, E., Korn, T. y Kuchroo, V. K. (2007). "Th17: the third member of the effector T cell trilogy." Curr Opin Immunol **19**(6): 652-657.
- Bezerra, M. C., Carvalho, J. F., Prokopowitsch, A. S. y Pereira, R. M. (2005). "RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss." Braz J Med Biol Res **38**(2): 161-170.
- Bidmon, H. J., Emde, B., Oermann, E., Kubitz, R., Witte, O. W. y Zilles, K. (2001). "Heme oxygenase-1 (HSP-32) and heme oxygenase-2 induction in neurons and glial cells of cerebral regions and its relation to iron accumulation after focal cortical photothrombosis." Exp Neurol **168**(1): 1-22.
- Bingham, C. O., 3rd (2002). "The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation." J Rheumatol Suppl **65**: 3-9.

7. Bibliografía

- Blumberg, S. N. y D. A. Fox (2001). "Rheumatoid arthritis: guidelines for emerging therapies." Am J Manag Care **7**(6): 617-626.
- Bockamp, E., Maringer, M., Spangenberg, C., Fees, S., Fraser, S., Eshkind, L., Oesch, F. y Zabel, B. (2002). "Of mice and models: improved animal models for biomedical research." Physiol Genomics **11**(3): 115-132.
- Boyce, B.F., Schwarz, E.M. y Xing, L. "Osteoclast precursors: cytokine-stimulated immunomodulators of inflammatory bone disease". Curr Opin Rheumatol 2006, **18**(4): 427-432.
- Brackertz, D., Mitchell, G. F. y Mackay, I. R. (1977). "Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice." Arthritis Rheum **20**(3): 841-850.
- Braggins, P. E., Trakshel, G. M., Kutty, R. K. y Maines, M. D (1986). "Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: comparison with the hematin-induced and constitutive isoforms of the liver." Biochem Biophys Res Commun **141**(2): 528-533.
- Brenchley, P. E. (2000). "Angiogenesis in inflammatory joint disease: a target for therapeutic intervention." Clin Exp Immunol **121**(3): 426-429.
- Bruhl, H., Wagner, K., Kellner, H., Schattenkirchner, M., Schlöndorff, D. y Mack, M. (2001). "Surface expression of CC- and CXC-chemokine receptors on leucocyte subsets in inflammatory joint diseases". Clin Exp Immunol**126**(3):551-559.
- Clarke, B. (2008). "Normal bone anatomy and physiology." Clin J Am Soc Nephrol **3** Suppl 3: S131-139.
- Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R. y Forster, I. (1999). "Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice." Transgenic Res **8**(4): 265-277.
- Colombrita, C., Calabrese, V., Stella, A. M., Mattei, F., Alkon, D. L. y Scapagnini, G. (2003). "Regional rat brain distribution of heme oxygenase-1 and manganese superoxide dismutase mRNA: relevance of redox homeostasis in the aging processes." Exp Biol Med (Maywood) **228**(5): 517-524.
- Cuadrado, A. y A. I. Rojo (2008). "Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases and brain infections." Curr Pharm Des **14**(5): 429-442.
- Chang, S. K., Gu, Z. y Brenner, M. B. (2010). "Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: the emerging role of cadherin-11." Immunol Rev **233**(1): 256-266.
- Chen, X. L., Dodd, G., Thomas, S., Zhang, X., Wasserman, M. A., Rovin, B. H. y Kunsch, C. (2006). "Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(5): H1862-1870.
- Chiang, N., Shinohara, M., Dalli, J., Mirakaj, V., Kibi, M., Choi, A. M. y Serhan, C. N. (2013). "Inhaled carbon monoxide accelerates resolution of inflammation via unique proresolving mediator-heme oxygenase-1 circuits". J Immunol**190**(12):6378-6388.
- Christianson, C. A., Dumlao, D. S., Stokes, J. A., Dennis, E. A., Svensson, C. I., Corr, M. y Yaksh, T. L. (2011). "Spinal TLR4 mediates the transition to a persistent mechanical

7. Bibliografía

- hypersensitivity after the resolution of inflammation in serum-transferred arthritis". Pain **152**(12):2881-2891.
- Combadiere, C., Potteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B., Merval, R., Proudfoot, A., Tedgui, A. y Mallat, Z. (2008). "Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice". Circulation**117**(13):1649-1657.
- Choy, E. H. y G. S. Panayi (2001). "Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis." N Engl J Med **344**(12): 907-916.
- Dacquin, R., Starbuck, M., Schinke, T. y Karsenty, G. (2002). "Mouse alpha1(I)-collagen promoter is the best known promoter to drive efficient Cre recombinase expression in osteoblast." Dev Dyn **224**(2): 245-251.
- Dawson, J., Sedgwick, A. D., Edwards, J. C. y Lees, P. (1991). "A comparative study of the cellular, exudative and histological responses to carrageenan, dextran and zymosan in the mouse." Int J Tissue React **13**(4): 171-185.
- Dayar, J. M. y E. Choy (2010). "Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor." Rheumatology (Oxford) **49**(1): 15-24.
- De Young, L. M., Kheifets, J. B., Ballaron, S. J. y Young, J. M. (1989). "Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents." Agents Actions **26**(3-4): 335-341.
- Devesa, I., Ferrandiz, M. L., Terencio, M. C., Joosten, L. A., van den Berg, W. B. y Alcaraz, M. J. (2005). "Influence of heme oxygenase 1 modulation on the progression of murine collagen-induced arthritis." Arthritis Rheum **52**(10): 3230-3238.
- Dieguez-Gonzalez, R., Calaza, M., Perez-Pampin, E., Balsa, A., Blanco, F. J., Canete, J. D., Caliz, R., Carreno, L., de la Serna, A. R., Fernandez-Gutierrez, B., Ortiz, A. M., Herrero-Beaumont, G., Pablos, J. L., Narvaez, J., Navarro, F., Marengo, J. L., Gomez-Reino, J. J. and Gonzalez, A. (2009). "Analysis of TNFAIP3, a feedback inhibitor of nuclear factor-kappaB and the neighbor intergenic 6q23 region in rheumatoid arthritis susceptibility." Arthritis Res Ther **11**(2): R42.
- Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparison with a control. Biometrics **20**, 482-491.
- Edwards, J. C., Sedgwick, A. D. y Willoughby, D. A. (1981). "The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system." J Pathol **134**(2): 147-156.
- Edwards, J. C., Szczepanski, L., Szechinski, J., Filipowicz-Sosnowska, A., Emery, P., Close, D. R., Stevens, R. M. y Shaw, T. (2004). "Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis." N Engl J Med **350**(25): 2572-2581.
- Eming, R., Visconti, K., Hall, F., Sekine, C., Kobayashi, K., Chen, Q., Sonderstrup, G. (2002). "Humanized mice as a model for rheumatoid arthritis." Arthritis Res **4 Suppl 3**: S133-140.
- Entezami, P., Fox, D. A., Clapham, P. J. y Chung, K. C. (2011). "Historical perspective on the etiology of rheumatoid arthritis." Hand Clin **27**(1): 1-10.

7. Bibliografía

- Erdmann, K., Grosser, N., Schipporeit, K. y Schroder, H. (2006). "The ACE inhibitory dipeptide Met-Tyr diminishes free radical formation in human endothelial cells via induction of heme oxygenase-1 and ferritin." J Nutr **136**(8): 2148-2152.
- Espada, S., Ortega, F., Molina-Jijon, E., Rojo, A. I., Perez-Sen, R., Pedraza-Chaverri, J., Miras-Portugal, M. T. y Cuadrado, A. (2010). "The purinergic P2Y(13) receptor activates the Nrf2/HO-1 axis and protects against oxidative stress-induced neuronal death." Free Radic Biol Med **49**(3): 416-426.
- Feldmann, M. y S. R. Maini (2008). "Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics." Immunol Rev **223**: 7-19.
- Ferrandiz, M. L., Maicas, N., Garcia-Arnanadis, I., Terencio, M. C., Motterlini, R., Devesa, I., Joosten, L. A., van den Berg, W. B. y Alcaraz, M. J. (2008). "Treatment with a CO-releasing molecule (CORM-3) reduces joint inflammation and erosion in murine collagen-induced arthritis." Ann Rheum Dis **67**(9): 1211-1217.
- Firestein, G. S. (2003). "Evolving concepts of rheumatoid arthritis." Nature **423**(6937): 356-361.
- Frey, O., Mitera, T., Kelchtermans, H., Schurgers, E., Kamradt, T. y Matthys, P. (2011). "Ameliorated course of glucose-6-phosphate isomerase (G6PI)-induced arthritis in IFN-gamma receptor knockout mice exposes an arthritis-promoting role of IFN-gamma." J Autoimmun **36**(2): 161-169.
- Furukawa, M. y Y. Xiong (2005). "BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase." Mol Cell Biol **25**(1): 162-171.
- Galli, S. J., N. Borregaard, y T. A. Wynn. (2011). "Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils". Nat Immunol**12**(11):1035-1044.
- Geiler, T., Kriegsmann, J., Keyszer, G. M., Gay, R. E. y Gay, S. (1994). "A new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal human cartilage into SCID mice." Arthritis Rheum **37**(11): 1664-1671.
- George, J. F., Braun, A., Brusko, T.M., Joseph, R., Bolisetty, S., Wasserfall, C.H., Atkinson, M.A., Agarwal, A y Kapturczak, M. H. (2008). "Suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is dependent on expression of heme oxygenase-1 in antigen-presenting cells". Am J Pathol**173**(1):154-160.
- Goronzy, J. J. y C. M. Weyand (2004). "T-cell regulation in rheumatoid arthritis." Curr Opin Rheumatol **16**(3): 212-217.
- Grosser, N., Oberle, S., Berndt, G., Erdmann, K., Hemmerle, A. y Schroder, H. (2004). "Antioxidant action of L-alanine: heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators." Biochem Biophys Res Commun **314**(2): 351-355.
- Gruber, B. L., Sorbi, D., French, D. L., Marchese, M. J., Nuovo, G. J., Kew, R. R. y Arbeit, L. A. (1996). "Markedly elevated serum MMP-9 (gelatinase B) levels in rheumatoid arthritis: a potentially useful laboratory marker." Clin Immunol Immunopathol **78**(2): 161-171.
- Guzman-Beltran, S., Espada, S., Orozco-Ibarra, M., Pedraza-Chaverri, J. y Cuadrado, A. (2008). "Nordihydroguaiaretic acid activates the antioxidant pathway Nrf2/HO-1 and protects cerebellar granule neurons against oxidative stress." Neurosci Lett **447**(2-3): 167-171.

7. Bibliografía

- Hamilton, J. A. y P. P. Tak (2009). "The dynamics of macrophage lineage populations in inflammatory and autoimmune diseases." Arthritis Rheum **60**(5): 1210-1221.
- Harder, Y., Amon, M., Schramm, R., Rucker, M., Scheuer, C., Pittet, B., Erni, D. y Menger, M. D. (2008). "Ischemia-induced up-regulation of heme oxygenase-1 protects from apoptotic cell death and tissue necrosis." J Surg Res **150**(2): 293-303.
- He, C. H., Gong, P., Hu, B., Stewart, D., Choi, M. E., Choi, A. M. y Alam, J. (2001). "Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation." J Biol Chem **276**(24): 20858-20865.
- Henningsson, L., Jirholt, P., Lindholm, C., Eneljung, T., Silverpil, E., Iwakura, Y., Linden, A. y Gjertsson, I. (2010). "Interleukin-17A during local and systemic Staphylococcus aureus-induced arthritis in mice." Infect Immun **78**(9): 3783-3790.
- Herman, S., Zurgil, N., Langevitz, P., Ehrenfeld, M. y Deutsch, M. (2008). "Methotrexate selectively modulates TH1/TH2 balance in active rheumatoid arthritis patients." Clin Exp Rheumatol **26**(2): 317-323.
- Herrero-Beaumont, G., Martinez Calatrava, M. J. y Castaneda, S. (2012). "Abatacept mechanism of action: concordance with its clinical profile." Reumatol Clin **8**(2): 78-83.
- Hoess, R. H. y K. Abremski (1984). "Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(4): 1026-1029.
- Hoess, R. H. y K. Abremski (1985). "Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system." J Mol Biol **181**(3): 351-362.
- Holmdahl, R., Rubin, K., Klareskog, L., Larsson, E. y Wigzell, H. (1986). "Characterization of the antibody response in mice with type II collagen-induced arthritis, using monoclonal anti-type II collagen antibodies." Arthritis Rheum **29**(3): 400-410.
- Holmdahl R., Sareila O., Olsson L.M., Backdahl L. y Wing K.: Ncf1 polymorphism reveals oxidative regulation of autoimmune chronic inflammation. Immunol Rev 2016, **269**(1): 228-247.
- Hong, F., Freeman, M. L. y Liebler, D. C. (2005). "Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane." Chem Res Toxicol **18**(12): 1917-1926.
- Hu, Y., Cheng, W., Cai, W., Yue, Y., Li, J. y Zhang, P. (2013). "Advances in research on animal models of rheumatoid arthritis." Clin Rheumatol **32**(2): 161-165.
- Ibanez, L., Alcaraz, M. J., Maicas, N., Guede, D., Caeiro, J. R., Motterlini, R. y Ferrandiz, M. L. (2012). "Downregulation of the inflammatory response by CORM-3 results in protective effects in a model of postmenopausal arthritis." Calcif Tissue Int **91**(1): 69-80.
- Ibanez, L., Ferrandiz, M. L., Brines, R., Guede, D., Cuadrado, A. y Alcaraz, M. J. (2014). "Effects of Nrf2 deficiency on bone microarchitecture in an experimental model of osteoporosis." Oxid Med Cell Longev **2014**: 726590.
- Ichihara, S., Yamada, Y., Liu, F., Murohara, T., Itoh, K., Yamamoto, M. y Ichihara, G. (2010). "Ablation of the transcription factor Nrf2 promotes ischemia-induced neovascularization by enhancing the inflammatory response." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(8): 1553-1561.

7. Bibliografía

- Inglis, J. J., Criado, G., Medghalchi, M., Andrews, M., Sandison, A., Feldmann, M. y Williams, R. O. (2007). "Collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is associated with a robust and sustained T-cell response to type II collagen." Arthritis Res Ther **9**(5): R113.
- Innamorato, N. G., Rojo, A. I., Garcia-Yague, A. J., Yamamoto, M., de Ceballos, M. L. y Cuadrado, A. (2008). "The transcription factor Nrf2 is a therapeutic target against brain inflammation." J Immunol **181**(1): 680-689.
- Isaacs, J. D. (2010). "The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all?" Nat Rev Immunol **10**(8): 605-611.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D. y Yamamoto, M. (1999). "Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain." Genes Dev **13**(1): 76-86.
- Iwanaga, T., Shikichi, M., Kitamura, H., Yanase, H. y Nozawa-Inoue, K. (2000). "Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint." Arch Histol Cytol **63**(1): 17-31.
- Jacobs, J. P., Ortiz-Lopez, A., Campbell, J. J., Gerard, C. J., Mathis, D. y C. Benoist. (2010). "Deficiency of CXCR2, but not other chemokine receptors, attenuates autoantibody-mediated arthritis in a murine model". Arthritis Rheum **62**(7):1921-1932.
- Jeong, G. S., Lee, D. S., Li, B., Lee, H. J., Kim, E. C. y Kim, Y. C. (2010). "Effects of sappanchalcone on the cytoprotection and anti-inflammation via heme oxygenase-1 in human pulp and periodontal ligament cells." Eur J Pharmacol **644**(1-3): 230-237.
- Ji, H., Pettit, A., Ohmura, K., Ortiz-Lopez, A., Duchatelle, V., Degott, C., Gravalles, E., Mathis, D., y C. Benoist. (2002). "Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis". J Exp Med**196**(1):77-85.
- Joosten, L. A., Lubberts, E., Durez, P., Helsen, M. M., Jacobs, M. J., Goldman, M. y van den Berg, W. B. (1997). "Role of interleukin-4 and interleukin-10 in murine collagen-induced arthritis. Protective effect of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction." Arthritis Rheum **40**(2): 249-260.
- Kamphuis, S., Kuis, W., de Jager, W., Teklenburg, G., Massa, M., Gordon, G., Boerhof, M., Rijkers, G. T., Uiterwaal, C. S., Otten, H. G., Sette, A., Albani, S. y Prakken, B. J. (2005). "Tolerogenic immune responses to novel T-cell epitopes from heat-shock protein 60 in juvenile idiopathic arthritis." Lancet **366**(9479): 50-56.
- Kapturczak, M., Wasserfall, H., C., Brusko, T., Campbell-Thompson, M., Ellis, T. M., Atkinson, M. A. y A. Agarwal. (2004). "Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse". Am J Pathol**165**(3):1045-1053.
- Kawane, K., Ohtani, M., Miwa, K., Kizawa, T., Kanbara, Y., Yoshioka, Y. y Nagata, S. (2006). "Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages." Nature **443**(7114): 998-1002.
- Kawashima, A., Oda, Y., Yachie, A., Koizumi, S. y Nakanishi, I. (2002). "Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case." Hum Pathol **33**(1): 125-130.
- Keffer, J., Probert, L., Cazlaris, H., Georgopoulos, S., Kaslaris, E., Kioussis, D., & Kollias, G. (1991). "Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis." EMBO J **10**(13): 4025-4031.

7. Bibliografía

- Kensler, T. W., Wakabayashi, N. y Biswal, S. (2007). "Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 89-116.
- Keystone, E. C., Schorlemmer, H. U., Pope, C. y Allison, A. C. (1977). "Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement." Arthritis Rheum **20**(7): 1396-1401.
- Kim, J., Cha, Y. N. y Surh, Y. J. (2010). "A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders." Mutat Res **690**(1-2): 12-23.
- Kim, K. W., Kim, H. R., Kim, B. M., Cho, M. L. y Lee, S. H. (2015). "Th17 Cytokines Regulate Osteoclastogenesis in Rheumatoid Arthritis." Am J Pathol **185**(11): 3011-3024.
- Kirino, Y., Takeno, M., Murakami, S., Kobayashi, M., Kobayashi, H., Miura, K., Ideguchi, H., Ohno, S., Ueda, A. y Ishigatsubo, Y. (2007). "Tumor necrosis factor alpha acceleration of inflammatory responses by down-regulating heme oxygenase 1 in human peripheral monocytes." Arthritis Rheum **56**(2): 464-475.
- Kirwan, J. R., Bijlsma, J. W., Boers, M. y Shea, B. J. (2007). "Effects of glucocorticoids on radiological progression in rheumatoid arthritis." Cochrane Database Syst Rev(1): CD006356.
- Kobayashi, A., Kang, M. I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T. y Yamamoto, M. (2004). "Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2." Mol Cell Biol **24**(16): 7130-7139.
- Koch, A. E., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., Johnson, B., Evanoff, H.L., Haines, G.K., Burdick, M.D., Pope, R.M. y R. Strieter, M.(1992). "Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis". J Clin Invest**90**(3):772-779.
- Koenders, M. I., Devesa, I., Marijnissen, R. J., Abdollahi-Roodsaz, S., Boots, A. M., Walgreen, B., di Padova, F. E., Nicklin, M. J., Joosten, L. A. y van den Berg, W. B. (2008). "Interleukin-1 drives pathogenic Th17 cells during spontaneous arthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice." Arthritis Rheum **58**(11): 3461-3470.
- Konno, S. y S. Tsurufuji (1983). "Induction of zymosan-air-pouch inflammation in rats and its characterization with reference to the effects of anticomplementary and anti-inflammatory agents." Br J Pharmacol **80**(2): 269-277.
- Konno, S. y S. Tsurufuji (1985). "Analysis of the factor(s) involved in pathogenesis of zymosan-induced inflammation in rats." Jpn J Pharmacol **38**(2): 177-184.
- Konrad, F.M., Knausberg, U., Hone, R., Ngamsri, K.C. y Reutershan, J.: Tissue heme oxygenase-1 exerts anti-inflammatory effects on LPS-induced pulmonary inflammation. Mucosal Immunol 2016, **9**(1): 98-111.
- Koobkokkrud, T., Kadotani, T., Mizutani, N. y Yoshino, S. (2013). "Efficient induction of arthritis in mice by an arthritogenic 4-clone cocktail of anti-type II collagen monoclonal antibodies recognizing different epitopes of the antigen." Biol Pharm Bull **36**(8): 1299-1304.
- Korganow, A. S., Ji, H., Mangialaio, S., Duchatelle, V., Pelandra, R., Martin, T., Degott, C., Kikutani, H., Rajewsky, K., Pasquali, J. L., Benoist, C. y Mathis, D. (1999). "From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins." Immunity **10**(4): 451-461.

7. Bibliografía

- Kouskoff, V., Korganow, A. S., Duchatelle, V., Degott, C., Benoist, C. y Mathis, D. (1996). "Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity." Cell **87**(5): 811-822.
- Kremer, J. M., Westhovens, R., Leon, M., Di Giorgio, E., Alten, R., Steinfeld, S., Russell, A., Dougados, M., Emery, P., Nuamah, I. F., Williams, G. R., Becker, J. C., Hagerty, D. T. y Moreland, L. W. (2003). "Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig." N Engl J Med **349**(20): 1907-1915.
- Kumar, S. y U. Bandyopadhyay (2005). "Free heme toxicity and its detoxification systems in human." Toxicol Lett **157**(3): 175-188.
- Lajas, C., Abasolo, L., Bellajdel, B., Hernandez-Garcia, C., Carmona, L., Vargas, E., Lazaro, P. y Jover, J. A. (2003). "Costs and predictors of costs in rheumatoid arthritis: a prevalence-based study." Arthritis Rheum **49**(1): 64-70.
- Lawrence, T., Willoughby, D. A. y Gilroy, D. W. (2002). "Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation." Nat Rev Immunol **2**(10): 787-795.
- Lee, L. y P. D. Sadowski (2001). "Directional resolution of synthetic holliday structures by the Cre recombinase." J Biol Chem **276**(33): 31092-31098.
- Lee, S. H., Sohn, D. H., Jin, X. Y., Kim, S. W., Choi, S. C. y Seo, G. S. (2007). "2',4',6'-tris(methoxymethoxy) chalcone protects against trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis and blocks tumor necrosis factor-alpha-induced intestinal epithelial inflammation via heme oxygenase 1-dependent and independent pathways." Biochem Pharmacol **74**(6): 870-880.
- Lee, Y. K. y J. M. Powers (2001). "Color and optical properties of resin-based composites for bleached teeth after polymerization and accelerated aging." Am J Dent **14**(6): 349-354.
- Lens, J. W., van den Berg, W. B., van de Putte, L. B. y van den Bersselaar, L. (1984). "Flare-up of antigen-induced arthritis in mice after challenge with oral antigen." Clin Exp Immunol **58**(2): 364-371.
- Livak, K. J. y T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Ma, Q. (2010). "Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications". Pharmacol Ther **125**(3):376-393.
- Ma, Y., Seiler, K. P., Eichwald, E. J., Weis, J. H., Teuscher, C. y Weis, J. J. (1998). "Distinct characteristics of resistance to *Borrelia burgdorferi*-induced arthritis in C57BL/6N mice." Infect Immun **66**(1): 161-168.
- Maccioni, M., Zeder-Lutz, G., Huang, H., Ebel, C., Gerber, P., Hergueux, J., Marchal, P., Duchatelle, V., Degott, C., van Regenmortel, M., Benoist, C. y Mathis, D. (2002). "Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice." J Exp Med **195**(8): 1071-1077.
- MacGregor, A. J., Snieder, H., Rigby, A. S., Koskenvuo, M., Kaprio, J., Aho, K. y Silman, A. J. (2000). "Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins." Arthritis Rheum **43**(1): 30-37.
- Maddison, P., Kiely, P., Kirkham, B., Lawson, T., Moots, R., Proudfoot, D., Reece, R., Scott, D., Sword, R., Taggart, A., Thwaites, C. y Williams, E. (2005). "Leflunomide in rheumatoid

7. Bibliografía

- arthritis: recommendations through a process of consensus." Rheumatology (Oxford) **44**(3): 280-286.
- Maicas, N., Ferrandiz, M. L., Brines, R., Ibanez, L., Cuadrado, A., Koenders, M. I., van den Berg, W. B. y Alcaraz, M. J. (2011). "Deficiency of Nrf2 accelerates the effector phase of arthritis and aggravates joint disease." Antioxid Redox Signal **15**(4): 889-901.
- Maicas, N., Ferrandiz, M. L., Devesa, I., Motterlini, R., Koenders, M. I., van den Berg, W. B. y Alcaraz, M. J. (2010). "The CO-releasing molecule CORM-3 protects against articular degradation in the K/BxN serum transfer arthritis model." Eur J Pharmacol **634**(1-3): 184-191.
- Maines, M. D. (1988). "Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications." FASEB J **2**(10): 2557-2568.
- Maines, M. D. y P. E. Gibbs (2005). "30 some years of heme oxygenase: from a "molecular wrecking ball" to a "mesmerizing" trigger of cellular events." Biochem Biophys Res Commun **338**(1): 568-577.
- Mancuso, C., Pani, G. y Calabrese, V. (2006). "Bilirubin: an endogenous scavenger of nitric oxide and reactive nitrogen species." Redox Rep **11**(5): 207-213.
- Martel-Pelletier, J., Welsch, D. J. y Pelletier, J. P. (2001). "Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases." Best Pract Res Clin Rheumatol **15**(5): 805-829.
- Matsumoto, I., Staub, A., Benoist, C. y Mathis, D. (1999). "Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme." Science **286**(5445): 1732-1735.
- Matsumoto, I., Maccioni, M., Lee, D.M., Maurice, M., Simmons, B., Brenner, M., Mathis, D. y Benoist, C. (2002). "How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease". Nat Immunol **3**(4):360-365.
- Matzelle, M. M., Gallant, M. A., Condon, K. W., Walsh, N. C., Manning, C. A., Stein, G. S., Lian, J. B., Burr, D.B. y Gravalles, E. M. (2012). "Resolution of inflammation induces osteoblast function and regulates the Wnt signaling pathway". Arthritis Rheum **64**(5):1540-1550.
- Matsuzaki, G. y M. Umemura (2007). "Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections." Microbiol Immunol **51**(12): 1139-1147.
- McCoubrey, W. K., Jr., Huang, T. J. y Maines, M. D. (1997). "Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis." J Biol Chem **272**(19): 12568-12574.
- Medzhitov, R. (2007). "Recognition of microorganisms and activation of the immune response." Nature **449**(7164): 819-826.
- Mellado, M., Martinez-Munoz, L., Cascio, G., Lucas, P., Pablos, J. L. y Rodriguez-Frade, J. M. (2015). "T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis." Front Immunol **6**: 384.
- Miossec, P., Korn, T. y Kuchroo, V. K. (2009). "Interleukin-17 and type 17 helper T cells." N Engl J Med **361**(9): 888-898.
- Mitsuishi, Y., Motohashi, H. y Yamamoto, M. (2012). "The Keap1-Nrf2 system in cancers: stress response and anabolic metabolism." Front Oncol **2**: 200.

7. Bibliografía

- Monach, P. A., Mathis, D. y Benoist, C. (2008). "The K/BxN arthritis model." Curr Protoc Immunol **Chapter 15**: Unit 15 22.
- Moroney, M. A., Alcaraz, M. J., Forder, R. A., Carey, F. y Hoult, J. R. (1988). "Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids." J Pharm Pharmacol **40**(11): 787-792.
- Ndisang, J. F., Tabien, H. E. y Wang, R. (2004). "Carbon monoxide and hypertension." J Hypertens **22**(6): 1057-1074.
- Nguyen, T., Sherratt, P. J. y Pickett, C. B. (2003). "Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element." Annu Rev Pharmacol Toxicol **43**: 233-260.
- Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Miyasaka, N., Yamamoto, K., Kawai, S., Takeuchi, T., Hashimoto, J., Azuma, J. y Kishimoto, T. (2004). "Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial." Arthritis Rheum **50**(6): 1761-1769.
- Nozawa-Inoue, K., Amizuka, N., Ikeda, N., Suzuki, A., Kawano, Y. y Maeda, T. (2003). "Synovial membrane in the temporomandibular joint--its morphology, function and development." Arch Histol Cytol **66**(4): 289-306.
- Olson, K. R. y J. A. Donald (2009). "Nervous control of circulation--the role of gasotransmitters, NO, CO, and H₂S." Acta Histochem **111**(3): 244-256.
- Orban, P. C., Chui, D. y Marth, J. D. (1992). "Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 6861-6865.
- Osburn, W. O., Karim, B., Dolan, P. M., Liu, G., Yamamoto, M., Huso, D. L. y Kensler, T. W. (2007). "Increased colonic inflammatory injury and formation of aberrant crypt foci in Nrf2-deficient mice upon dextran sulfate treatment." Int J Cancer **121**(9): 1883-1891.
- Ovchinnikov, D. A., Deng, J. M., Ogunrinu, G. y Behringer, R. R. (2000). "Col2a1-directed expression of Cre recombinase in differentiating chondrocytes in transgenic mice." Genesis **26**(2): 145-146.
- Pablos Alvarez, J. L. (2009). "[Interleukin 6 in the physiopathology of rheumatoid arthritis]." Reumatol Clin **5**(1): 34-39.
- Pan, M., Kang, I., Craft, J. y Yin, Z. (2004). "Resistance to development of collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is due to a defect in secondary, but not in primary, immune response." J Clin Immunol **24**(5): 481-491.
- Parfenova, H., Basuroy, S., Bhattacharya, S., Tcheranova, D., Qu, Y., Regan, R. F. y Leffler, C. W. (2006). "Glutamate induces oxidative stress and apoptosis in cerebral vascular endothelial cells: contributions of HO-1 and HO-2 to cytoprotection." Am J Physiol Cell Physiol **290**(5): C1399-1410.
- Parfenova, H., Neff, R. A., 3rd, Alonso, J. S., Shlopov, B. V., Jamal, C. N., Sarkisova, S. A. y Leffler, C. W. (2001). "Cerebral vascular endothelial heme oxygenase: expression, localization, and activation by glutamate." Am J Physiol Cell Physiol **281**(6): C1954-1963.

7. Bibliografía

- Park, S. Y., Lee, S. W., Shin, H. K., Chung, W. T., Lee, W. S., Rhim, B. Y., Hong, K. W. y Kim, C. D. (2010). "Cilostazol enhances apoptosis of synovial cells from rheumatoid arthritis patients with inhibition of cytokine formation via Nrf2-linked heme oxygenase 1 induction." Arthritis Rheum **62**(3): 732-741.
- Paul, W.E. (2013). *Fundamental Immunology*. 7th ed. Philadelphia and Nueva York: Lippincott, Williams y Wilkins.
- Pennanen, N., Lapinjoki, S., Palander, A., Urtti, A. y Monkkonen, J. (1995). "Macrophage-like RAW 264 cell line and time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA) as tools in screening drug effects on cytokine secretion." Int J Immunopharmacol **17**(6): 475-480.
- Pittock, S. T., Norby, S. M., Grande, J. P., Croatt, A. J., Bren, G. D., Badley, A. D., Caplice, N. M., Griffin, M. D. y K. A. Nath. (2005). "MCP-1 is up-regulated in unstressed and stressed HO-1 knockout mice: Pathophysiologic correlates". Kidney Int**68**(2):611-622.
- Poss, K. D. y S. Tonegawa. (1997a). "Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization". Proc Natl Acad Sci USA**94**(20):10919-10924.
- Poss, K. D. y S. Tonegawa (1997b). "Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 10925-10930.
- Postic, C. y M. A. Magnuson (2000). "DNA excision in liver by an albumin-Cre transgene occurs progressively with age." Genesis **26**(2): 149-150.
- Postigo, J., Iglesias, M., Cerezo-Wallis, D., Rosal-Vela, A., Garcia-Rodriguez, S., Zubiaur, M., Sancho, J., Merino, R. y Merino, J. (2012). "Mice deficient in CD38 develop an attenuated form of collagen type II-induced arthritis." PLoS One **7**(3): e33534.
- Rahman, Q., Mahmood, N., Khan, S. G., Arif, J. M. y Athar, M. (1997). "Mechanism of asbestos-mediated DNA damage: role of heme and heme proteins." Environ Health Perspect **105 Suppl 5**: 1109-1112.
- Reff, M. E., Carner, K., Chambers, K. S., Chinn, P. C., Leonard, J. E., Raab, R., Newman, R. A., Hanna, N. y Anderson, D. R. (1994). "Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20." Blood **83**(2): 435-445.
- Reinhardt, R. L., Kang, S. J., Liang, H. E. y Locksley, R. M. (2006). "T helper cell effector fates--who, how and where?" Curr Opin Immunol **18**(3): 271-277.
- Rickert, R. C., Roes, J. y Rajewsky, K. (1997). "B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice." Nucleic Acids Res **25**(6): 1317-1318.
- Robinson, J. P. y G. F. Babcock (1998). Phagocyte function : a guide for research and clinical evaluation. New York, Wiley-Liss.
- Rodak, F.B. (2005) *Hematología, Fundamentos y aplicaciones clínicas*, Buenos Aires, Argentina: editorial Panamericana.
- Roig, D. (2000). "Manifestaciones clínicas articulares en la artritis reumatoide." Rev Clin Esp **200** Supl 1: 39-45
- Rueda, B., Oliver, J., Robledo, G., Lopez-Nevot, M. A., Balsa, A., Pascual-Salcedo, D., Gonzalez-Gay, M. A., Gonzalez-Escribano, M. F. y Martin, J. (2007). "HO-1 promoter

7. Bibliografía

- polymorphism associated with rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **56**(12): 3953-3958.
- Rushworth, S. A. y M. A. O'Connell (2004). "Haem oxygenase-1 in inflammation." Biochem Soc Trans **32**(Pt 6): 1093-1094.
- Ryter, S. W. y L. E. Otterbein (2004). "Carbon monoxide in biology and medicine." Bioessays **26**(3): 270-280.
- Sakaguchi, N., Takahashi, T., Hata, H., Nomura, T., Tagami, T., Yamazaki, S. y Sakaguchi, S. (2003). "Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice." Nature **426**(6965): 454-460.
- Sakinienė, E. y L. V. Collins (2002). "Combined antibiotic and free radical trap treatment is effective at combating Staphylococcus-aureus-induced septic arthritis." Arthritis Res **4**(3): 196-200.
- Santos, L. L., Morand, E. F., Hutchinson, P., Boyce, N. W. y Holdsworth, S. R. (1997). "Anti-neutrophil monoclonal antibody therapy inhibits the development of adjuvant arthritis." Clin Exp Immunol **107**(2): 248-253.
- Sawa, S., Kamimura, D., Jin, G. H., Morikawa, H., Kamon, H., Nishihara, M., Ishihara, K., Murakami, M. y Hirano, T. (2006). "Autoimmune arthritis associated with mutated interleukin (IL)-6 receptor gp130 is driven by STAT3/IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD4+ T cells." J Exp Med **203**(6): 1459-1470.
- Saxne, T. y D. Heinegard (1992). "Synovial fluid analysis of two groups of proteoglycan epitopes distinguishes early and late cartilage lesions." Arthritis Rheum **35**(4): 385-390.
- Scott, D. L., Wolfe, F. y Huizinga, T. W. (2010). "Rheumatoid arthritis." Lancet **376**(9746): 1094-1108.
- Schettler, A., Thorn, H., Jockusch, B. M. y Tschesche, H. (1991). "Release of proteinases from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Evidence for subclasses of the main granule types and their association with cytoskeletal components." Eur J Biochem **197**(1): 197-202.
- Schipper, H. M., Song, W., Zukor, H., Hascalovici, J. R. y Zeligman, D. (2009). "Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: expanding frontiers of engagement." J Neurochem **110**(2): 469-485.
- Schur, P.H., Gabriel, S.E. y Crowson, C.S. Epidemiology of risk factors for and possible causes of rheumatoid arthritis. UpToDate 2014. www.uptodate.com
- Schurgers, E., Billiau, A. y Matthys, P. (2011). "Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon-gamma." J Interferon Cytokine Res **31**(12): 917-926.
- Schwenk, F., Baron, U. y Rajewsky, K. (1995). "A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells." Nucleic Acids Res **23**(24): 5080-5081.

7. Bibliografía

- Seder, R. A. (1995). "The role of IL12 in the regulation of Th1 and Th2 differentiation." Res Immunol **146**(7-8): 473-476.
- Sedlak, T. W. y S. H. Snyder (2004). "Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle." Pediatrics **113**(6): 1776-1782.
- Singh, J. A., Christensen, R., Wells, G. A., Suarez-Almazor, M. E., Buchbinder, R., Lopez-Olivo, M. A., Tanjong Ghogomu, E. y Tugwell, P. (2009). "Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews." Cochrane Database Syst Rev(4): CD007848.
- Solomon, S., Rajasekaran, N., Jeisy-Walder, E., Snapper, S. B. y Illges, H. (2005). "A crucial role for macrophages in the pathology of K/B x N serum-induced arthritis". Eur J Immunol**35**(10):3064-3073.
- Song, H., Bergstrasser, C., Rafat, N., Hoger, S., Schmidt, M., Endres, N., Goebeler, M., Hillebrands, J. L., Brigelius-Flohe, R., Banning, A., Beck, G., Loesel, R. y Yard, B. A. (2009). "The carbon monoxide releasing molecule (CORM-3) inhibits expression of vascular cell adhesion molecule-1 and E-selectin independently of haem oxygenase-1 expression." Br J Pharmacol **157**(5): 769-780.
- Sternberg, N., Hamilton, D. y Hoess, R. (1981). "Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome." J Mol Biol **150**(4): 487-507.
- Stocker, R. (2004). "Antioxidant activities of bile pigments." Antioxid Redox Signal **6**(5): 841-849.
- Stuart, J. M. y F. J. Dixon (1983). "Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice." J Exp Med **158**(2): 378-392.
- Suliman, H. B., Carraway, M. S., Velsor, L. W., Day, B. J., Ghio, A. J. y Piantadosi, C. A. (2002). "Rapid mtDNA deletion by oxidants in rat liver mitochondria after hemin exposure." Free Radic Biol Med **32**(3): 246-256.
- Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Peng, S. L. y Glimcher, L. H. (2003). "Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses." Annu Rev Immunol **21**: 713-758.
- Szekanecz, Z., G. K. Haines, T. R. Lin, L. A. Harlow, S. Goerdts, G. Rayan, y A. E. Koch. (1994). "Differential distribution of intercellular adhesion molecules (ICAM-1, ICAM-2, and ICAM-3) and the MS-1 antigen in normal and diseased human synovia. Their possible pathogenetic and clinical significance in rheumatoid arthritis". Arthritis Rheum**37**(2):221-231.
- Tak, P. P. y J. R. Kalden (2011). "Advances in rheumatology: new targeted therapeutics." Arthritis Res Ther **13 Suppl 1**: S5.
- Teissier, E., Nohara, A., Chinetti, G., Paumelle, R., Cariou, B., Fruchart, J. C., Brandes, R. P., Shah, A. y B. Staels. (2004). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces NADPH oxidase activity in macrophages, leading to the generation of LDL with PPAR-alpha activation properties". Circ Res **95**(12):1174-1182.
- Teitelbaum, S. L. (2000). "Bone resorption by osteoclasts." Science **289**(5484): 1504-1508.
- Trentham, D. E., Townes, A. S. y Kang, A. H. (1977). "Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis." J Exp Med **146**(3): 857-868.

7. Bibliografía

- Tzima, S., Victoratos, P., Kranidioti, K., Alexiou, M. y Kollias, G. (2009). "Myeloid heme oxygenase-1 regulates innate immunity and autoimmunity by modulating IFN-beta production." J Exp Med **206**(5): 1167-1179.
- Vachharajani, T. J., J. Work, A. C. Issekutz, y D. N. Granger. (2000). "Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds". Am J Physiol Heart Circ Physiol**278**(5):H1613-H1617.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. y Telser, J. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". Int J Biochem Cell Biol **39**(1):44-84.
- van der Woude, D., Lie, B. A., Lundstrom, E., Balsa, A., Feitsma, A. L., Houwing-Duistermaat, J. J., Verduijn, W., Nordang, G. B., Alfredsson, L., Klareskog, L., Pascual-Salcedo, D., Gonzalez-Gay, M. A., Lopez-Nevot, M. A., Valero, F., Roep, B. O., Huizinga, T. W., Kvien, T. K., Martin, J., Padyukov, L., de Vries, R. R. y Toes, R. E. (2010). "Protection against anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis is predominantly associated with HLA-DRB1*1301: a meta-analysis of HLA-DRB1 associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in four European populations." Arthritis Rheum **62**(5): 1236-1245.
- Van Duyne, G. D. (2001). "A structural view of cre-loxp site-specific recombination." Annu Rev Biophys Biomol Struct **30**: 87-104.
- van Gaalen, F. A., Toes, R. E., Ditzel, H. J., Schaller, M., Breedveld, F. C., Verweij, C. L. y Huizinga, T. W. (2004). "Association of autoantibodies to glucose-6-phosphate isomerase with extraarticular complications in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **50**(2): 395-399.
- Verpoort, K. N., Cheung, K., Ioan-Facsinay, A., van der Helm-van Mil, A. H., de Vries-Bouwstra, J. K., Allaart, C. F., Drijfhout, J. W., de Vries, R. R., Breedveld, F. C., Huizinga, T. W., Pruijn, G. J. y Toes, R. E. (2007). "Fine specificity of the anti-citrullinated protein antibody response is influenced by the shared epitope alleles." Arthritis Rheum **56**(12): 3949-3952.
- Vincent, T. L., Williams, R. O., Maciewicz, R., Silman, A. y Garside, P. (2012). "Mapping pathogenesis of arthritis through small animal models." Rheumatology (Oxford) **51**(11): 1931-1941.
- Wagener, F. A., Toonen, E. J., Wigman, L., Fransen, J., Creemers, M. C., Radstake, T. R., Coenen, M. J., Barrera, P., van Riel, P. L. y Russel, F. G. (2008). "HMOX1 promoter polymorphism modulates the relationship between disease activity and joint damage in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **58**(11): 3388-3393.
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Kang, M. I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T. W. y Talalay, P. (2004). "Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 2040-2045.
- Walsh, D. A. y C. I. Pearson (2001). "Angiogenesis in the pathogenesis of inflammatory joint and lung diseases." Arthritis Res **3**(3): 147-153.
- Watts, G. M., Beurskens, F. J., Martin-Padura, I., Ballantyne, C. M., Klickstein, L. B., Brenner, M. B. y Lee, D. M. (2005). "Manifestations of inflammatory arthritis are critically dependent on LFA-1". J Immunol**174**(6):3668-3675.

7. Bibliografía

- Wegiel, B., Hedblom, A., Li, M., Gallo, D., Csizmadia, E., Harris, C., Nemeth, Z., Zuckerbraun, B. S., Soares, M., Persson, J. L. y Otterbein, L. E. (2014). "Heme oxygenase-1 derived carbon monoxide permits maturation of myeloid cells". Cell Death & Disease **5**(3):e1139.
- Wipke, B. T. y P. M. Allen. (2001). "Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis". J Immunol **167**(3):1601-1608.
- Wooley, P.H., Grimm M.J. y Radin, E.L. (2005). The structure and function of joints, in *Arthritis and allied conditions*, Eds. Koopman, W.J. y Moreland, L. W. 15th Ed., Lippincott, Williams y Wilkins. p. 149-173.
- Wooley, P. H., Luthra, H. S., Griffiths, M. M., Stuart, J. M., Huse, A. y David, C. S. (1985). "Type II collagen-induced arthritis in mice. IV. Variations in immunogenetic regulation provide evidence for multiple arthritogenic epitopes on the collagen molecule." J Immunol **135**(4): 2443-2451.
- Wooley, P. H., Luthra, H. S., Stuart, J. M. y David, C. S. (1981). "Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates." J Exp Med **154**(3): 688-700.
- Wooley, P. H., Seibold, J. R., Whalen, J. D. y Chapdelaine, J. M. (1989). "Pristane-induced arthritis. The immunologic and genetic features of an experimental murine model of autoimmune disease." Arthritis Rheum **32**(8): 1022-1030.
- Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., Ohta, K., Kasahara, Y. y Koizumi, S. (1999). "Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency." J Clin Invest **103**(1): 129-135.
- Yu, A. L., Lu, C. Y., Wang, T. S., Tsai, C. W., Liu, K. L., Cheng, Y. P., Chang, H. C., Lii, C. K. y Chen, H. W. (2010). "Induction of heme oxygenase 1 and inhibition of tumor necrosis factor alpha-induced intercellular adhesion molecule expression by andrographolide in EA.hy926 cells." J Agric Food Chem **58**(13): 7641-7648.
- Zwerina, J., Redlich, K., Schett, G. y Smolen, J.S. (2005). "Pathogenesis of rheumatoid arthritis: targeting cytokines." Ann N Y Acad Sci **1051**: 716-729.
- Zwerina, J., Tzima, S., Hayer, S., Redlich, K., Hoffmann, O., Hanslik-Schnabel, B., Smolen, J.S., Kollias, G. y Schett, G. (2005). "Heme oxygenase 1 (HO-1) regulates osteoclastogenesis and bone resorption." FASEB J **19**(14): 2011-2013.

Anexos

8.1 Artículos publicados durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral:

Deficiency of Nrf2 accelerates the effector phase of arthritis and aggravates joint disease

Autores: N. Maicas, M.L. Ferrándiz, R. Brines, L. Ibáñez, A. Cuadrado, M.I. Koenders, W.B. van den Berg, M.J. Alcaraz

Revista: Antioxidants & Redox Signaling - 2011

Heme oxygenase-1 regulates the progression of K/BxN serum transfer arthritis

Autores: R. Brines, N. Maicas, M.L. Ferrándiz, A. Loboda, A. Jozkowicz, J. Dulak, M.J. Alcaraz

Revista: Plos One - 2012

CO-Releasing Binuclear Rhodium Complexes as Inhibitors of Nitric Oxide Generation in Stimulated Macrophages

Autores: M.E. Moragues, R. Brines, M.C. Terencio, F. Sancenón, R. Martínez-Mañez, M.J. Alcaraz

Revista: Inorganic Chemistry - 2013

Effects of Nrf2 deficiency on bone microarchitecture in an experimental model of osteoporosis.

Autores: L. Ibáñez, M.L. Ferrándiz, R. Brines, D. Guede, A. Cuadrado, M.J. Alcaraz.

Revista: Oxidative Medicine and Cellular Longevity - 2014

8. Anexos

8.2 Informes del Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal:

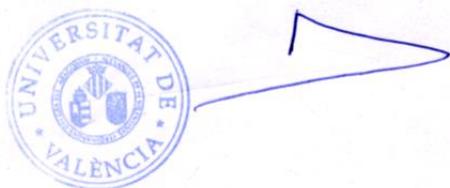
VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA
Vicerectorat d'Investigació i Política Científica

DR. PEDRO CARRASCO SORLÍ
Presidente del Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la
Universitat de València

CERTIFICA:

Que, reunido el Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal el día 9 de febrero de 2009, acordó informar FAVORABLEMENTE la realización en sus instalaciones del protocolo de experimentación animal, presentado en el proyecto titulado **“Modelos pre-clínicos en la evaluación de nuevos fármacos para enfermedades osteoarticulares”**, presentado por el Dra. M^a Luisa Ferrándiz Manglano.

En Valencia, a 9 de febrero de 2009.



Carrer: Blasco Ibáñez, 13
VALÈNCIA 46071

Telèfon: (96) 386 41 09
Fax: (96) 386 42 24
e-mail: vicerec.investigacio@uv.es



DIRECCIÓN GENERAL DE PRODUCCIÓN AGRARIA Y GANADERÍA

Ciutat Administrativa 9 d'Octubre
Castán Tobeñas, 77. Edif. B3 P2 46018 VALENCIA

AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2014 / 019 / UVEG / 030

Vista la solicitud realizada en fecha 21 de febrero de 2014 con nº reg. entrada 2748 por D. Pedro M. Carrasco Sorli Vicerrector de Investigación y Política Científica de la Universidad de Valencia, centro usuario **ES46250 0001010**, para realizar el procedimiento:

“Mecanismos celulares reguladores de la respuesta inflamatoria en patologías articulares crónicas”

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Sanidad y Bienestar Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2014/019/UVEG/030 tipo 2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universidad de Valencia-Estudio General**

Responsable del proyecto: **M^a Luisa Ferrándiz Manglano**

Establecimiento: **Animalario de mamífero superior**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, 14 de marzo de 2014

El director general de Producción Agraria y Ganadería

José Miguel Ferrer Arranz



