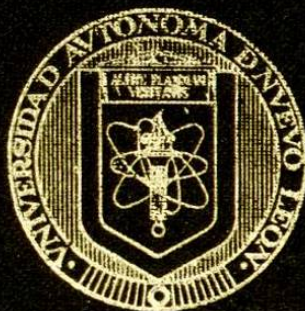


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



**EFFECTO DE LA INFECCION BACTERIANA EN LA
EVOLUCION DE LA ARTRITIS EN EL RATON MRL/Ipr**

POR

ANNA VELIA VAZQUEZ MARMOLEJO

**Como requisito parcial para obtener el Grado DE DOCTOR
EN CIENCIAS con Especialidad en INMUNOLOGIA**

Septiembre, 1998

FD
RC933
V3
c.1



1080080367

12232

TD
RCPJR
EV.

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



EFFECTO DE LA INFECCION BACTERIANA EN LA
EVOLUCION DE LA ARTRITIS EN EL RATON MRL/lpr

EFFECTO DE LA INFECCION BACTERIANA EN LA
EVOLUCION DE LA ARTRITIS EN EL RATON MRL/lpr

POR

ANNA VELIA VAZQUEZ MARMOLEJO
POR

Como requisito parcial para obtener el Grado DE DOCTOR EN
CIENCIAS con Especialidad en INMUNOLOGIA
ANNA VELIA VAZQUEZ MARMOLEJO

Como requisito parcial para obtener el Grado DE DOCTOR
EN CIENCIAS con Especialidad en INMUNOLOGIA

Septiembre, 1998

Septiembre, 1998

TD
RC933
.V3



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**

**EFFECTO DE LA INFECCION BACTERIANA EN LA
EVOLUCION DE LA ARTRITIS EN EL RATON MRL/lpr**

POR

ANNA VELIA VAZQUEZ MARMOLEJO


**Como requisito parcial para obtener el Grado DE DOCTOR EN
CIENCIAS con Especialidad en INMUNOLOGIA**

Septiembre, 1998

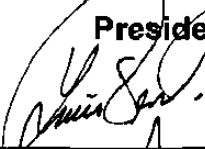


**EFFECTO DE LA INFECCION BACTERIANA EN LA EVOLUCION DE
LA ARTRITIS EN EL RATON MRL/lpr**

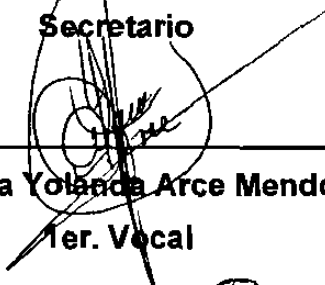
Aprobación de la tesis:



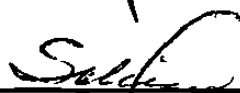
Dr. Mario Alberto Garza Elizondo
Presidente



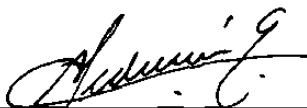
Dr. Lucio Vera Cabrera
Secretario



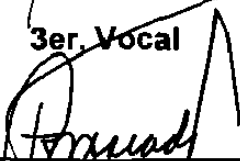
Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza
1er. Vocal



Dr. Mario César Salinas Carmona
2do. Vocal



Dr. Carlos Eduardo Medina De la Garza
3er. Vocal




Dr. Roberto Mercado Longoria
Subdirector de Investigación y Estudios de Posgrado.

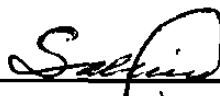
**EFFECTO DE LA INFECCION BACTERIANA EN LA EVOLUCION DE LA
ARTRITIS EN EL RATON MRL/lpr**

Presentado por: QFB MC Anna Velia Vázquez Marmolejo

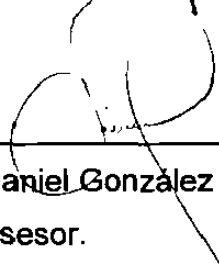
Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría del Dr. Mario Alberto Garza Elizondo y la co-asesoría del Dr. Mario César Salinas Carmona, el Dr. Daniel González Spencer, y la M.C. Irma Rositas Martínez. Apoyado parcialmente por el PAICYT bajo el convenio No. SA 097-98 de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



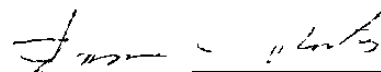
Dr. Mario Alberto Garza Elizondo
Asesor Doctoral.



Dr. Mario César Salinas Carmona
Co-Asesor.



Dr. Daniel González Spencer
Co-Asesor.



M.C. Irma Rositas Martínez
Co-Asesora.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento primeramente a Dios y después al Dr. Mario Albero Garza Elizondo, asesor de mi tesis. Así como al Dr. Mario César Salinas Carmona, al Dr. Daniel González Spencer y a la M.C. Irma Rositas Martínez, por su valiosa colaboración como co-asesores. Al Dr. Lucio Vera Cabrera, a la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza y al Dr. Carlos Eduardo Medina De la Garza por sus sugerencias e interés, en la revisión del *presente trabajo*.

A la Técnica Silvia Navarro Pizarro, al Técnico Reynaldo Rodríguez Pecina, al Q.C.B. Edgar Gamaliel Muñiz Nava, a la Dra. Angeles Castro Corona, al Dr. Juan Antonio Luna De la Rosa y a la Secretaria Norma Sánchez Reyes. Gracias por su valiosa asistencia para la realización de este trabajo.

Al personal de los Departamentos de Inmunología, Reumatología, Patología, Microbiología y Posgrado de la Facultad de Medicina de la UANL. A mis Maestros, a mis Amigos y a mi Familia, por el apoyo que me brindaron en todo momento.

Al Consejo Nacional De Ciencia Y Tecnología, por el apoyo económico para la realización de mis estudios con la beca No. 89883

INDICE GENERAL

CONTENIDO	PAGINA
RESUMEN	xi
INTRODUCCION	1
HIPOTESIS	18
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y METODOS	20
1. Animales de Laboratorio	20
2. Antígenos y Microorganismos	20
2.1 Adyuvante Completo de Freund	20
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.3 <i>Nocardia brasiliensis</i>	20
2.4 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	20
2.5 Polisacáridos de Neumococo	20
3. Preparación de los Inóculos Bacterianos	20
3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
3.2 <i>Nocardia brasiliensis</i>	21
3.3 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	22
4. Inmunizaciones	23

4.1 Artritis Activada por Adyuvante	23
4.2 Estandarización de la Dosis Infectante de Bacterias en el Ratón BALB/c	23
4.3 Artritis Activada por Adyuvante más Infección	24
4.4 Ratones MRL/lpr con Infección	24
4.5 Ratones MRL/lpr Inmunizados con Polisacáridos de Neumococo	24
5. Evaluación Clínica, Inmunológica e Histopatológica de la Artritis	24
5.1 Evaluación Clínica	24
5.2 Obtención de Suero	25
5.3 Determinación de Citocinas	25
5.4 Evaluación Histopatológica	25
6. Análisis Estadístico	26
RESULTADOS	27
1. Artritis Activada por Adyuvante	27
2. Estandarización de la Dosis Infectante de Bacterias en el Ratón BALB/c	35
3. Artritis Activada por Adyuvante más Infección por <i>Staphylococcus aureus</i> o <i>Nocardia brasiliensis</i>	36

4. Ratones MRL/lpr con Infección por <i>Staphylococcus aureus</i> o <i>Nocardia brasiliensis</i>	38
5. Ratones MRL/lpr Inmunizados con Polisacáridos de Neumococo	40
6. Determinación de los Niveles Séricos de IL-6, FNT-alfa e IFN-gamma	42
DISCUSION	46
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFIA	55
LISTA DE ABREVIATURAS	69
APENDICE	70

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1. Evaluación Clínica de la Artritis Activada por Adyuvante en el Ratón MRL/lpr	29
2. Articulación Tibio-Femoral en el Ratón MRL/lpr	30
3. Etapas del Daño Articular	31
4. Histopatología de la Articulación en Artritis Activada por Adyuvante en el Ratón MRL/lpr	33
5. Lesiones Extra-Articulares en la Artritis en el Ratón MRL/lpr	34
6. Histopatología de la Articulación en Artritis Activada por Adyuvante más Infección en el Ratón BALB/c	38
7. Histopatología de la Articulación en Ratones MRL/lpr Infeccionados por <i>Staphylococcus aureus</i> o <i>Nocardia brasiliensis</i>	40
8. Histopatología de la Articulación en Ratones MRL/lpr Inmunizados con Polisacáridos de Neumococo	42
9. Niveles Séricos de IL-6 en los Diferentes Grados de Daño Articular en el Ratón MRL/lpr	43
10. Niveles Séricos de FNT-alfa en los Diferentes Grados de Daño Articular en el Ratón MRL/lpr	44

11. Niveles Séricos de IFN-gamma en los Diferentes Grados de Daño

Articular en el Ratón MRL/lpr.

45

LISTA DE TABLAS

TABLA	PAGINA
I. Histopatología de la Articulación en Artritis Activada por Adyuvante, en el Ratón MRL/lpr	32
II. Determinación de la Dosis Optima Infeccionante de Bacterias en el Ratón BALB/c, Probadas en el Ratón MRL/lpr	36
III. Histopatología de la Articulación en Ratones MRL/lpr con Artritis Activada por Adyuvante más Infección con <i>Staphylococcus aureus</i> o <i>Nocardia brasiliensis</i>	37
IV. Histopatología de la Articulación en Ratones MRL/lpr Infeccionados con <i>Staphylococcus aureus</i> o <i>Nocardia brasiliensis</i>	39
V. Histopatología de la Articulación en Ratones Inmunizados con Antígenos Polisacáridos de Neumococo.	41

RESUMEN

Anna Velia Vázquez Marmolejo

Septiembre de 1998

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: EFECTO DE LA INFECCION BACTERIANA EN LA EVOLUCION DE LA ARTRITIS EN EL RATON MRL/lpr.

Número de Páginas 70


Candidato al Grado de Doctor en Ciencias con Especialidad en Inmunología.

Area de estudio: Inmunología

Propósito y Método del Estudio: La Artritis Reumatoide es una enfermedad sistémica autoinmune de etiología desconocida. Existen hipótesis de que los agentes infecciosos actúan como factor desencadenante en el desarrollo de la enfermedad. En el presente trabajo nosotros estudiamos el efecto de las infecciones por *Staphylococcus aureus*, *Nocardia brasiliensis*, y la inmunización con polisacáridos de neumococo en la evolución de la artritis en el ratón MRL/lpr, que están genéticamente predispuesto al desarrollo de la enfermedad. Los Ratones MRL/lpr de 12 -15 semanas de edad fueron infectados con una u otra bacteria o con polisacáridos de neumococo y 6 semanas después fueron evaluados en forma clínica e histopatológica para el desarrollo de artritis; además, al final del tratamiento, se midió la concentración en suero de citocinas pro-inflamatorias como la IL-6, FNT-alfa e INF-gamma.

Contribuciones y conclusiones:

El estudio histopatológico reveló que la infección por *Staphylococcus aureus* o *Nocardia brasiliensis* activó en forma temprana la enfermedad, pero *Nocardia brasiliensis* limitó el grado de daño hasta la etapa de erosión de cartilago, en el 100% de los animales estudiados. La reinmunización con antígenos polisacáridos de neumococo disminuyó significativamente el número de los ratones que desarrollaron la enfermedad. Además se encontró que la concentración en suero de las citocinas pro-inflamatorias no estuvo relacionada con el grado de daño histopatológico.



Dr. Mario Alberto Garza Elizondo
Asesor Doctoral.

INTRODUCCION

Las enfermedades autoinmunes son síndromes clínicos en los cuales el daño tisular parece ser el resultado de respuestas aberrantes del sistema inmune a antígenos propios. Existe un grupo de enfermedades reumáticas que son incluidas en esta categoría. Algunos investigadores consideran que el mecanismo central de estas enfermedades sea debido a un defecto en la tolerancia inmunológica, que ocasiona la activación y expansión de clonas de linfocitos T y B específicas para antígenos propios. Así mismo, la producción de autoanticuerpos circulantes y liberación de un gran número de citocinas y otros mediadores de la inflamación, que ocasionan una lesión tisular en el órgano blanco (Zvaifler, 1985).

La idea de que algunos microorganismos, entre ellos bacterias, virus y parásitos, pueden estar involucrados entre los factores ambientales que inician y perpetúan la respuesta inmune contra lo propio, ha ejercido una poderosa influencia sobre la investigación de las enfermedades autoinmunes (Friedman, 1991). Esta idea se fortalece por el hecho de que la respuesta inmune participa activamente en el reconocimiento de lo propio y en la eliminación de agentes agresores del medio ambiente (Behar y Porcelli, 1995).

POSIBLES MECANISMOS DE INDUCCION DE ENFERMEDAD AUTOINMUNE POR AGENTES INFECCIOSOS.

MIMETISMO MOLECULAR POR ANTIGENOS MICROBIANOS.

Los microorganismos contienen una multitud de antígenos extraños que colectivamente comprenden el principal grupo de determinantes antigénicos reconocidos por el sistema inmune. Estos antígenos incluyen una amplia variedad de carbohidratos, lípidos, proteínas y ADN que pueden ser reconocidos por receptores específicos de células B, y macrófagos; en cambio los receptores de antígeno de células T reconocen casi exclusivamente *péptidos derivados de antígenos proteicos*. El que un microbio y su hospedero compartan determinantes antigénicos se llama mimetismo molecular (Damian, 1964). La reactividad cruzada entre los antígenos microbianos y tejidos propios por anticuerpos séricos, ha sido demostrada experimentalmente en muchas situaciones en humanos y animales de laboratorio (Porcelli, 1993). El estudio de la secuencia de proteínas ha revelado muchos epítopes de células T que son compartidos entre especies microbianas y mamíferos (Baum, 1993). De esta forma, se ha propuesto un mecanismo por el cual los microorganismos pueden "disparar" respuestas anti "lo propio", al estimular al sistema inmune con antígenos microbianos que tengan similitud con componentes tisulares propios. En presencia de esta fuerte respuesta inmune hacia el microbio agresor, clonas de células B y T de reacción cruzada "responden" hacia *antígenos propios homólogos que normalmente no podrían ser inmunogénicos*. De esta forma una respuesta inmune protectora contra un microbio invasor se

transforma en una respuesta autoinmune que puede ser transitoria y autolimitada o, bajo la influencia de diferentes factores ambientales y del hospedero, crónica o recurrente. La evolución clínica de la enfermedad autoinmune va a depender de las características cualitativas de la respuesta inmune (celular o humoral, el tipo de citocinas predominantemente producidas, etc.) y la distribución en los tejidos de los antígenos propios que actúan como blanco particular (Tar, 1985).

Esta hipótesis podría proporcionar una explicación para las condiciones inflamatorias asociadas con respuestas autoinmunes que ocurren en infecciones por distintos microorganismos como la infección no supurativa producida por el estreptococo A (fiebre reumática o glomerulonefritis); o infecciones por *Shigella flexneri* (enfermedad de Reiter post-diarreica); y por *Clamydia trachomatis*, asociada con artritis reactiva (Silveira, 1992; Calin, 1979; Rahman, 1992).

Recientemente han emergido estudios en modelos animales en los cuales se habla de la existencia de un extenso repertorio de antígenos propios que normalmente no son accesibles al sistema inmune pero que se pueden exponer por la inducción de una respuesta inflamatoria dirigida contra antígenos propios (Behar y Porcelli, 1995).

Las versiones iniciales de esta idea se enfocaron sobre “sitios secuestrados o inmunológicamente privilegiados”, por ejemplo localizaciones anatómicas que no son accesibles al sistema inmune debido a la avascularidad (córnea) o debido a barreras anatómicas (por ejemplo la cápsula de Bowman en el riñón,

el tejido tiroideo, o los testículos). Más recientemente, se ha reconocido que los antígenos existen en todos los sitios anatómicos que normalmente no son reconocidos por el sistema inmune, debido a que las células presentadoras de antígeno normalmente no los procesan ni los presentan eficientemente para su reconocimiento por las células T. Estos antígenos propios que normalmente no son reconocidos por el sistema inmune, colectivamente son referidos como "autocrípticos" (Sercarz, 1993).

El reconocimiento de esta situación permite hacernos una pregunta central acerca de la activación de las células T autorreactivas:

¿Qué es lo que conduce a la presentación de antígenos inicialmente crípticos que activan a las células T autorreactivas? y ¿cómo es que la exposición a diferentes organismos infecciosos puede modificar el procesamiento?

Algunos estudios sugieren que sustancias derivadas de bacterias patógenas o que forman parte de la flora corporal normal, pueden aumentar la presentación de antígenos crípticos y conducir a la activación de células T autorreactivas (Goverman, 1993).

Recientemente ha sido reportado que en ratas transgénicas (HLA-B27) que desarrollan artropatías espontáneas, la enfermedad clínica y los cambios patológicos son más atenuados en aquellos animales que nacen y se mantienen en condiciones estériles libres de gérmenes (Hammer, 1990, Taurog, 1994).

Esto sugiere que la activación de la enfermedad autoinmune en estos animales también puede ser desencadenada por productos de la flora microbiana ubicua, posiblemente a través de un mecanismo que induce la presentación de epitopes previamente autocrípticos.

ENFERMEDAD AUTOINMUNE POR PATOGENOS PERSISTENTES.

En ciertas enfermedades consideradas autoinmunes, como la Artritis Reumatoide (AR) o el Síndrome de Reiter, se cree que el reconocimiento continuo de los antígenos propios da lugar a la fase crónica de la enfermedad. Sin embargo, en experimentos recientes se ha dilucidado que la enfermedad inflamatoria que anteriormente se creía que era de naturaleza autoinmune, actualmente puede estar causada por una respuesta inmune contra antígenos microbianos no viables, persistentes en los tejidos blanco o incluso contra organismos infecciosos viables ocultos. Tales situaciones dificultan la distinción entre enfermedades infecciosas y autoinmunes lo que aumenta la posibilidad de que algunos síndromes clasificados como enfermedades autoinmunes puedan ser en realidad infecciones crónicas (Behar y Porcelli, 1995).

PERSISTENCIA DE ANTIGENOS MICROBIANOS.

La persistencia o el depósito repetido de antígenos microbianos es un mecanismo potencial por el cual los organismos patogénicos podrían causar la enfermedad inflamatoria crónica. Un posible ejemplo de este mecanismo es la inflamación articular que algunas veces sigue a infecciones no articulares y que

tradicionalmente han sido clasificadas como artritis reactiva y artritis postinfecciosa; esta última es una sinovitis mediada principalmente por depósito de antígenos extraños en forma de complejos inmunes; por ejemplo la artritis asociada con hepatitis B aguda (Wands, 1975), infecciones diseminadas agudas con meningococos (Jarret, 1980) o gonococos (Goldenberg, 1983). En contraste, la artritis reactiva ocurre en una subpoblación de pacientes algunas semanas después de diarrea bacteriana aguda (Granfors, 1992) o infecciones urogenitales por *Clamidia trachomatis* (Rahman, 1992, Silveira, 1992). Esto generalmente se piensa que ocurre después de la eliminación de los agentes infecciosos y sus productos; se presume que se originan de un mecanismo como el mimetismo molecular.

Investigaciones recientes (Kaufmann, 1993) parecen demostrar que el antígeno HLA-B27 y otras moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I pueden estar involucradas en la presentación de antígenos bacterianos a células T (predominantemente CD8+), durante la iniciación de la artritis reactiva cuando los organismos viables están presentes dentro de los macrófagos y posiblemente otro tipo de células. En contraste, durante las fases crónicas y recurrentes de la artritis, las cuales parecen estar caracterizadas por la presencia de antígenos bacterianos persistentes y no organismos viables, la presentación de antígenos puede ser predominantemente por moléculas del CMH-II con activación de células TCD4+. Una verdadera prueba de la validez de tal modelo requiere el análisis detallado de las clonas de células T aisladas de la membrana sinovial de los pacientes con artritis reactiva a diferentes

tiempos después del establecimiento de su enfermedad. Esta área de investigación podría conducir a nuevas estrategias terapéuticas basadas en la eliminación de las infecciones celulares o antígenos persistentes dependiendo de la etapa de la enfermedad (Lauhio, 1991).

SUPERANTIGENOS BACTERIANOS.

El descubrimiento de los superantígenos bacterianos y la clasificación de sus mecanismos de acción han tenido una profunda influencia en el estudio de la inmunidad a la infección y más recientemente también han comenzado a tener impacto significativo en el estudio de las enfermedades autoinmunes (Tumang, 1990). Los superantígenos ejercen sus efectos sobre las células T al unir los receptores de antígeno de las células T a moléculas del CMH-II expresadas sobre células presentadoras de antígeno, y no requieren procesamiento (Marrack, 1990). El reconocimiento de un superantígeno por una célula T puede tener algunas consecuencias diferentes incluyendo la proliferación y expansión o la inducción prolongada de no-respuesta (anergia) o aún la apoptosis (Mc. Donald, 1993; Rammense, 1989). Los factores que determinan cuál de estas alternativas se vuelve predominante aún no están bien comprendidos.

La capacidad de un superantígeno para activar a células T en la mayoría de los casos, depende solamente de la expresión por la célula T de un subgrupo de elementos V β . Estos segmentos variables son propios del receptor de célula T. Puesto que la activación es dependiente sólo de V β y no de otros elementos variables del receptor de células T, un sólo tipo de superantígeno es

capaz de activar una subpoblación mayor de células T que lo que hacen los péptidos derivados de antígenos proteicos, convencionalmente aún más inmunogénicos. Esta propiedad coloca a los superantígenos entre las sustancias inmunoestimuladoras más potentes. Los mecanismos patogénicos por los cuales los superantígenos disparan los síndromes clínicos no son enteramente claros, pero probablemente dependen de su capacidad para activar un gran número de células T. Las diferentes manifestaciones que resultan pueden ser principalmente una consecuencia de la producción desregulada de citocinas derivadas de células T y otros mediadores solubles de la inflamación (Miethke, 1992).

RETROVIRUS Y AUTOINMUNIDAD.

Debido a su capacidad para integrarse permanentemente al genoma de la célula huésped y persistir por toda la vida del animal como un parásito intracelular (Schupbach, 1989), estos agentes virales pueden crear una situación en la cual la distinción entre lo propio y lo no propio no es clara. Aunque evidencias directas relacionan la infección de los virus a las enfermedades autoinmunes en una manera causal, aún se carece de modelos animales que demuestren que la infección de retrovirus oculta conduce a una enfermedad inflamatoria crónica: como ejemplo tenemos al virus de la encefaloartritis caprina (Mc Guire, 1990; Kennedy-Stoskopf, 1989), este virus causa una infección persistente que resulta en artritis, encefalitis y pneumonitis intersticial. Las lesiones patológicas que se desarrollan en los animales infectados son consideradas similares en muchas maneras a ciertas

enfermedades autoinmunes espontáneas humanas, particularmente AR. Este virus es ubicuo e infecta a la mayoría de su especie hospedera pero sólo una pequeña proporción de los animales infectados desarrolla la enfermedad. Esto parece indicar que existe una interacción del virus con factores de susceptibilidad genética o ambiental que determinan el desarrollo eventual de la patología tisular autoagresiva como ha sido postulado que ocurre para los *síndromes de la enfermedad autoinmune humana*.

ARTRITIS REUMATOIDE.

La AR es una enfermedad sistémica autoinmune de etiología desconocida. Su característica primordial es de una enfermedad crónica, simétrica, inflamatoria de la membrana sinovial que erosiona y destruye el cartilago de las articulaciones periféricas. (Schumacher, 1993).

Predomina en las mujeres en proporción 3:1; aparece en la edad adulta temprana o media, si bien se ha registrado en personas de todas las edades. Se ha estimado que la prevalencia está alrededor de 1-3% de la población (Barnes, 1970). Su diagnóstico es compatible con una gran variedad de presentaciones y un curso clínico que puede evolucionar desde unas cuantas semanas o meses de malestar, hasta muchos años con profunda discapacidad, ya que el diagnóstico puede ser obvio sólo con el paso del tiempo. (Halberg, 1994).

Al igual que la mayoría de las enfermedades autoinmunes, se piensa que la AR es producida por una interacción entre factores genéticos y ambientales tales como los agentes infecciosos (Inmman, 1992).

a) **FACTORES GENETICOS:** Existe una tendencia familiar para la AR. Sin embargo, muchos casos ocurren sin historia familiar y se conocen como AR "esporádica", ambas formas de AR están asociadas con moléculas del CMH de clase II: HLA-DR4 y, en menor grado con DR-1. Las moléculas HLA clase I y III muestran menor o rara asociación con la AR (Halberg, 1994).

Puesto que las moléculas de clase II están involucradas en la presentación de antígenos a células TCD4+, se ha sugerido que la tercera región hipervariable de la cadena beta DR-1 y DR-4 incrementan la susceptibilidad a la enfermedad al controlar la unión del péptido artritogénico. Una explicación razonable es que los péptidos DR asociados con AR predisponen al hospedero a una respuesta o posiblemente una falta de respuesta inmune apropiada a un agente etiogénico ambiental (Brostoff, 1994).

b) **AGENTES INFECCIOSOS:** La hipótesis de que los agentes infecciosos actúan por lo menos como un factor desencadenante, si no como perpetuante, ha inspirado décadas de la investigación clínica. A pesar de los esfuerzos de investigadores clínicos de la era de microbiología reciente, ha sido una meta inalcanzable definir una etiología infecciosa para la AR (Inman 1992). Los agentes microbianos asociados con AR incluyen virus como el Epstein-Barr, rubéola, retrovirus, parvovirus;(Wilder 1991) y recientemente el virus de la hepatitis C (Hirohata 1992), bacterias como micoplasma, micobacterias

(Moreland 1991) y diferentes organismos entéricos (Thompson 1994). El que no se pueda demostrar la presencia del microorganismo en el cultivo no excluye su relación con la AR; debido a que está claro que la bacteria muerta, la pared celular, toxinas y otros componentes del microorganismo tienen la capacidad de inducir enfermedad articular inflamatoria crónica. Por ejemplo el peptidoglucano de la pared celular de muchas bacterias induce artritis destructiva severa crónica, semejante a la AR, en animales de experimentación genéticamente predispuestos (Brostoff, 1994). Además, se ha reportado que la proteína A que contiene el *Staphylococcus aureus* de la cepa Cowan I es un potente estimulador de la producción in vitro de Factor Reumatoide (FR), por linfocitos de individuos sanos (Tar, 1985; Goldenstein, 1986).

INMUNOHISTOPATOLOGIA DE LA ARTICULACION.

La inmunohistopatología de la articulación incluye la presencia de macrófagos que predominan en el borde de la sinovial (Shinohara, 1992); y células TCD4+ las cuales secretan factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (FSC-GM) y altos niveles de factor de necrosis tumoral (FNT), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6). El FNT, IL-1 e IL-6 están claramente involucrados en el proceso artrítico, puesto que las 3 citocinas están presentes en fluido sinovial y pueden ser detectadas inmunohistoquímicamente en la membrana sinovial reumatoidea inflamada (Deleuran 1992 y Farahat, 1993). Además los niveles locales y sistémicos de cada citocina proinflamatoria corresponden a la actividad de la enfermedad (Eastgate 1988, Westacott 1990 y Feldmann 1990). Por otra parte, el FNT y la IL-1 tienen un efecto catabólico sobre el cartílago articular de numerosas

especies (Dingle 1987 y Shinmei 1989). La proliferación espontánea de sinoviocitos reumatoideos puede ser inhibida por anticuerpos anti-FNT (Brennan 1989). Evidencias directas de que FNT e IL-1 representan un papel en la patogénesis de artritis experimental, ha sido obtenido en modelos animales en los cuales el bloqueo de estas citocinas retrasa el establecimiento de la artritis inducida por colágeno; suprime la inflamación y disminuye la destrucción de cartílago que corresponde a la respuesta anti-inflamatoria (Wooley 1993, Van den Berg, 1994, Williams 1992, Piguet 1992 y Thorbecke, 1992). Lo anterior indica que IL-1, FNT e IL-6 junto con otras citocinas, juegan un papel crítico en la respuesta inflamatoria de fase aguda.

El interferón gamma (IFN-gamma) es una citocina secretada por células T activadas y células NK que promueve la inflamación al activar macrófagos e inducir la expresión de moléculas del CMH y de adhesión celular (Haas 1997). Se han encontrado niveles significativamente elevados de IFN-gamma en sueros de pacientes con desórdenes autoinmunes; se ha sugerido una asociación entre el desarrollo de Lupus Eritematoso Sistémico y la regulación defectuosa de IFN-gamma (Haas,1997). Los bajos niveles de interleucina 2 (IL-2) pueden deberse a la acción de inhibidores o a la alta afinidad con los receptores para IL-2. En el líquido sinovial predominan las células TCD8+ (Sokoloff, 1985). A lo largo de la membrana y alrededor de los pequeños vasos se encuentran células B y células plasmáticas productoras de FR. Los autoanticuerpos como el FR forman complejos inmunes que ocasionan una inflamación localizada en la articulación. La respuesta inflamatoria exagerada

incluye enzimas de degradación que causan la destrucción característica de la enfermedad (Shinohara, 1992).

Las células B que sintetizan y secretan anticuerpos anti-colágena tipo II también son abundantes. Algunas características de ellas las distinguen de otras células B, por ejemplo, un porcentaje significativo expresa el antígeno de superficie CD5 el cual normalmente es expresado en células T.

Además se encuentran polimorfonucleares adheridos al endotelio vascular y en líquido sinovial donde pueden llegar a constituir más del 50 % de las células presentes (Klippel, 1994). En sangre la proporción CD4+/CD8+ es normal, responden en forma muy pobre a la estimulación con mitógenos y la respuesta se corrige al agregar IL-2, lo que sugiere una deficiencia funcional en esta citocina; otra interpretación es que las células T ya están estimuladas al máximo como resultado del proceso patológico y por lo tanto los mitógenos tienen poco efecto adicional.

El número de células B es normal en sangre periférica en pacientes con AR, sin embargo la subpoblación de células B que lleva el marcador CD5 se encuentra incrementada (Cassali, 1987).

MODELOS ANIMALES DE ARTRITIS.

Una principal dificultad en el entendimiento de la etiología y de los mecanismos patogénicos de la AR ha sido la falta de un modelo animal adecuado. La artritis inducida por adyuvante (Pearson, 1956), la inducida por pared celular de estreptococo (Cromartie, 1977), por pristano (Wooley, 1989), y

la exacerbada por IL-1 (Hom, 1988; Killar, 1989) han sido estudiadas frecuentemente en diferentes especies animales. La principal dificultad en el uso de estos modelos es que son experimentalmente inducidos, autolimitantes y carentes de muchas de las características físico-patológicas encontradas en la enfermedad del humano. Recientemente modelos animales con patología articular semejante a la AR en el humano han sido reportados en ratones, como la cepa MRL/lpr que ha sido uno de los más activamente estudiados. (Andrews, 1978; Nakamura, 1991; Bouvet, 1990; Nordling, 1992).

RATON MRL/lpr.

En 1982 los ratones MRL/lpr (usados extensivamente en la patogénesis del Lupus) fueron reportados por desarrollar espontáneamente linfadenopatía masiva con una hipergamaglobulinemia, presencia de autoanticuerpos, altos niveles de proteínas de fase aguda, plasmacitosis, glomerulonefritis y una enfermedad parecida a la AR al final la vida (Andrews, 1978; Hang 1982). La mutación *lpr* causa defectos funcionales en el antígeno *Fas*, el cual media la apoptosis (Haas 1997). Las grandes y pequeñas articulaciones de los miembros posteriores de los ratones hembras presentan una patología articular semejante a la AR en el humano.

El examen histológico de las articulaciones demostró: proliferación de células sinoviales; formación de pannus; erosión del cartílago articular adyacente a las células sinoviales proliferantes; a los 6-7 meses de edad hubo destrucción del cartilago del menisco, formación de fibrocartilago y destrucción del hueso subcondrial, en cierta proporción de ratones MRL/lpr. También puede ser encontrado un infiltrado de linfocitos T y B en el tejido sinovial de los

ratones afectados, sin embargo, su presencia y contribución a la patogenia de la enfermedad permanecen en controversia.

Al igual que en el humano, la patología de la articulación está asociada con niveles altos de FR IgM e IgG circulantes, así como la presencia de anticuerpos a proteínas de la matriz extracelular (Andrews, 1978; Hang, 1982; O'Sullivan 1985; Tanaka, 1988; Pataki, 1985; Theofilopoulos, 1981; Edwards, 1986; Tarkowski, 1987; Abe, 1981; Eisenberg, 1979; Izui, 1980; Gay, 1987 y Ratkay, 1991). En resumen, esta cepa de ratón exhibe 4 características importantes en AR:

- a) FR IgM e IgG
- b) Excesiva proliferación de linfocitos TCD4+ determinada genéticamente.
- c) Poliartritis clínicamente evidente de los miembros posteriores.
- d) Poliarteritis

Además presentan hipergamaglobulinemia, complejos inmunes circulantes (Hang, 1982); desarrollan autoanticuerpos como los anti-cardiolipina (Hess, 1993), anti-DNA (Klinman, 1993) y glomerulonefritis asociada a complejos inmunes. Son deficientes en sintetizar receptores para IL-2, producir IL-2 y también *para proliferar con mitógenos o anticuerpos monoclonales contra receptores de células T* (Hammond, 1993). La IL-6 sérica se incrementa con la edad (Tang, 1991); por el contrario el FNT-alfa es normal (Levin, 1991). Cuando los ratones son tratados con superantígenos bacterianos se reduce la nefritis lúpica y la supresión de la enfermedad se asocia con una reducción específica de las células T doble negativas y V β 8+ (Kim, 1991). También el

tratamiento a largo plazo con anti-CD4+ disminuye la inmunopatología y la linfoproliferación, pero no suprime la producción de FR. En el ratón MRL/lpr el daño renal, la linfoproliferación, la producción de anticuerpos anti-Sm, anti-DNA de doble cadena, los niveles elevados de la IgG total, todos están ligados a la función de células TCD4+; en contraste, la producción de la IgM total y la IgM con actividad de FR parece ser el resultado de la actividad de células BCD5+ que no está regulada por células TCD4+ (Sullivan, 1991). Entre otras características, se ha observado que estos ratones normalmente no responden al estímulo con eritrocitos de carnero (Glasser, 1992).

Desafortunadamente este modelo no ha sido muy útil para el estudio de protocolos terapéuticos, debido a que las manifestaciones significativas de la artropatía aparecen al final de la vida del animal.

Investigaciones más recientes han estudiado a corto plazo el efecto de las inyecciones del adyuvante completo de Freund sobre la progresión de la artropatía en el ratón MRL/lpr (Ratkay, 1993). De estos estudios encontraron que una sola inyección intradérmica aumenta en forma reproducible la frecuencia y la agresividad de la enfermedad en el ratón joven (16 semanas de edad), en un 82 % de las hembras y machos de los animales inyectados. El mecanismo por el cual el adyuvante completo de Freund desencadena en forma temprana artritis en estos ratones todavía no está muy claro; se cree que resulte de una reacción cruzada entre el antígeno de micobacteria y un componente proteoglucano de cartílago, pero aún se requieren más estudios de laboratorio. Sin embargo, el hecho de que los animales inyectados con

adyuvante desarrollen la enfermedad 5 veces más que los animales controles, hace que este modelo sea de gran utilidad para la investigación de diferentes protocolos terapéuticos (Ratkay, 1993).

Aún cuando se han realizado muchos estudios que sugieren que los *microorganismos* tienen un papel importante en el desencadenamiento de la AR (Taylor, 1978), todavía no está clara su participación en los mecanismos de inducción de las etapas de actividad y remisión en la enfermedad ya establecida. Por tal motivo consideramos que es necesario realizar estudios, en animales de experimentación, que se enfoquen al conocimiento del efecto de los *microorganismos* en la evolución de la enfermedad.

HIPOTESIS

La artritis activada por adyuvante en el ratón MRL/lpr es exacerbada por la infección bacteriana.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el efecto de la infección por 3 especies bacterianas en la evolución de la artritis activada por adyuvante en el ratón MRL/lpr.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Reproducir el modelo de artritis activada por adyuvante en el ratón MRL/lpr.
2. Estandarizar la dosis infectante de *Staphylococcus aureus*, *Nocardia brasiliensis* y *Streptococcus pneumoniae* en el ratón BALB/c.
3. Evaluar en forma clínica, histológica, e inmunológica:
 - a) Ratones MRL/lpr con artritis activada por adyuvante y modificada por la infección con la bacteria respectiva.
 - b) Ratones MRL/lpr infectados con la bacteria respectiva.
 - c) Ratones MRL/lpr inmunizados con polisacáridos de neumococo.

MATERIALES Y METODOS

1. ANIMALES DE LABORATORIO: Se utilizaron ratones de la cepa MRL/lpr, con predisposición genética al desarrollo de artritis; y ratones con sistema inmune normal de la cepa BALB/c; ambas cepas procedentes de Laboratorios Jackson (Jackson Laboratories Me. USA). Se utilizaron ratones hembras y machos de 12-15 semanas de edad.

2. ANTIGENOS Y MICROORGANISMOS:

2.1 Adyuvante completo de Freund (ACF) con 10mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* H 37 Ra inactivadas con calor (Difco, Detroit, MI), se preparó como una emulsión aceite en agua y se utilizaron 50µl por cada ratón.

2.2 *Staphylococcus aureus*, ATCC 12598

2.3 *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1, ATCC 700358

2.4 *Streptococcus pneumoniae*, ATCC 6303

2.5 Polisacáridos de neumococo (Pneumovax lote 329D, 23 tipos de polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae*, 25 µg de cada tipo/500 µl) La concentración utilizada fue de 0.15 µg de cada tipo en 50 µl por ratón.

3. PREPARACION DE LOS INOCULOS BACTERIANOS:

3.1 *Staphylococcus aureus*. En un tubo estéril con 3 ml de caldo infusión cerebro-corazón (BHI, Difco Laboratories) se depositó una asada del vial liofilizado y se incubó a 37°C durante 24 hrs. De este cultivo se transfirió una

asada a un medio de agar sangre en caja de Petri por aislamiento de estría y se incubó nuevamente a 37°C 18-24 hrs para mantener el cultivo viable. La estandarización de la concentración del inóculo se llevó a cabo por el método de turbidimetría y cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC) de la siguiente forma: De un cultivo de 18 hrs en caldo nutritivo se hicieron diluciones de 10^{-1} a 10^{-7} , se tomó lectura de la densidad óptica de cada dilución a 600 nm y además se transfirió un ml de cada dilución a placas de Petri a las cuales se vació 30 ml de agar nutritivo licuado a 50°C y se incubó a 37°C durante 24 hrs. Se contó el número de UFC en las placas donde hubo un número mayor de 30 y menor de 300. De esta forma se seleccionó la dilución en la cual se obtuvo un inóculo con 1×10^7 UFC y a partir de éste se ajustó el volumen correspondiente a las diferentes concentraciones de bacterias a probar en el ratón BALB/c.

3.2 *Nocardia brasiliensis*. A partir de un cultivo de *Nocardia brasiliensis* en agar dextrosa-Sabouraud se inoculó una asada en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 30 ml de caldo BHI y se incubó a 37°C en baño de agua con agitación (GCA/Precision Scientific, Ch. USA) durante 48 hrs. Los cultivos se transfirieron a tubos de 50 ml y se centrifugaron a $166 \times g$ durante 10 min en una centrífuga Beckman TJ-6 (Beckman Instruments, Ca. USA); posteriormente la masa bacteriana se lavó con solución salina fisiológica dos veces más. Las bacterias se disgregaron con un agitador de vidrio y se resuspendieron en solución salina fisiológica; se dejaron sedimentar y el sobrenadante se utilizó para inocular 8 matraces Erlenmeyer con 30 ml de caldo BHI, los cuales se

incubaron a 37°C en baño con agitación durante 48 hrs. El crecimiento bacteriano apareció como una película seca y cerosa en la superficie del medio. Las bacterias se recuperaron y lavaron 3 veces con solución salina a 166Xg, y se homogeneizaron en un Potter-Elvehem. El homogenizado de *Nocardia brasiliensis* representa la suspensión unicelular bacteriana utilizada como inóculo.

Una vez obtenido el inóculo, una parte se guardó a 4°C y con la otra se realizaron diluciones para sembrar en placa en agar BHI y contar el número de colonias que crecen a los 3 días; con el propósito de ajustar al número deseado de UFC/ml con el inóculo almacenado a 4°C.

3.3 *Streptococcus pneumoniae*. A partir del vial del liofilizado se tomó una asada de bacterias y se colocó en un tubo de 13 X 100 mm con 5 ml de sangre humana, se mezcló perfectamente y se dejó incubar a 37°C durante 24 hrs. De este cultivo se transfirió una asada a medio de agar sangre en caja Petri, por aislamiento de estría y se incubó a 37°C durante 24 hrs. Una vez que se observó el crecimiento de colonias de *Streptococcus pneumoniae* se hizo una suspensión de bacterias en solución salina fisiológica en tubo de 12 X 75 mm y se ajustó a un 72% de absorbancia, con el nefelómetro del equipo de VITEK (DR100, Co. USA). A partir de esta absorbancia, que equivale a 6×10^8 , se hicieron diluciones con solución salina y se sembró en placas de agar sangre para contar el número de colonias y ajustar al número deseado de UFC/ml para cada concentración.

4. INMUNIZACIONES:

4.1 ARTRITIS ACTIVADA POR ADYUVANTE. Un grupo de 12 ratones MRL/lpr, se inocularon con 0.05 ml de ACF por vía intradérmica en 2 sitios torácicos, con aguja de 29 X 13 mm y se observaron durante 4 semanas para reproducir el modelo de artritis activada por adyuvante. Se compararon con 2 grupos de ratones controles, el primer grupo de la misma edad y el segundo con más de 24 semanas como control de artritis espontánea (especímenes seniles), ambos sin tratamiento. Además se incluyó un tercer grupo el cual se inoculó con ACF para activar artritis por adyuvante el cual, después de 1 semana se inoculó por vía intraperitoneal con ciclofosfamida en una concentración de 5 mg/Kg de peso/día durante 5 semanas, con el propósito de tener un control de remisión de la enfermedad (Omata, T. 1997).

4.2 ESTANDARIZACION DE LA DOSIS INFECTANTE DE BACTERIAS EN EL

RATON BALB/c. Para cada una de las bacterias se probaron diferentes dosis de UFC: para *Staphylococcus aureus*, de 1×10^6 a 5×10^6 ; para *Nocardia brasiliensis*, 1×10^7 a 4×10^7 ; para *Streptococcus pneumoniae*, 3×10^3 a 3×10^7 . Posteriormente se inoculó cada una de las dosis en 50 μ l de solución salina fisiológica por vía subcutánea dorsal. Se utilizaron 3 animales para cada una de las dosis probadas. En el caso de *Staphylococcus aureus* y *Nocardia brasiliensis* se observó al animal durante 12 días para la aparición de un absceso que pusiera de manifiesto la infección sin que muriera el animal; en el caso de *Streptococcus pneumoniae*, los animales que sobrevivieron a las dosis probadas

después de 5 días, se sometieron a un hemocultivo para comprobar la infección. Posteriormente la dosis óptima fue probada en el ratón MRL/lpr.

4.3 ARTRITIS ACTIVADA POR ADYUVANTE MAS INFECCION. Tres grupos de 12 ratones MRL/lpr se inocularon con ACF para activar artritis por adyuvante. Después de 4 semanas de observación, cada ratón se inoculó por vía subcutánea dorsal con la dosis infectante de la bacteria respectiva y se dejaron en observación 2 semanas más, con el propósito de determinar si la infección modificaba de alguna forma la evolución de la artritis.

4.4 RATONES MRL/lpr CON INFECCION. Tres grupos de 12 ratones MRL/lpr se inocularon con la dosis infectante de cada una de las bacterias respectivas por vía subcutánea dorsal y se observaron durante 6 semanas.

4.5 RATONES MRL/lpr INMUNIZADOS CON POLISACARIDOS DE NEUMOCOCO. Un grupo de 7 ratones de la cepa MRL/lpr se inmunizaron con polisacáridos de *Streptococcus pneumoniae* vía subcutánea dorsal una sola vez y se dejaron en observación 6 semanas. Otro grupo de 8 ratones recibió una primoinmunización y después se reinmunizó cada 2 semanas. Después de su última inmunización se dejaron en observación 2 semanas más.

5. EVALUACION CLINICA, INMUNOLOGICA E HISTOPATOLOGICA DE LA ARTRITIS:

5.1 EVALUACION CLINICA. Los ratones fueron evaluados por un investigador ajeno al tratamiento cada segundo día durante 4 semanas después de la inyección con ACF, con el objeto de visualizar la artritis y registrarla como positiva, en caso de observar eritema e inflamación en al menos una pata

anterior o posterior. Las mediciones de las articulaciones inflamadas fueron hechas con un vernier. Después de la inoculación con la bacteria respectiva los ratones se observaron durante 2 semanas con el propósito de observar la aparición de un absceso en el sitio de la infección, en el caso de *Staphylococcus aureus* o *Nocardia brasiliensis*; en el caso de *Streptococcus pneumoniae* después de 5 días de la infección, se realizó un hemocultivo en agar soya tripticasa para demostrar la infección.

5.2 OBTENCION DE SUERO. Al final del estudio se tomaron muestras de sangre por punción cardiaca a cada grupo de ratones. Se separaron los sueros y se congelaron a -70° C para llevar a cabo la determinación de citocinas por el método de ELISA.

5.3 DETERMINACION DE CITOCINAS. Se determinó la concentración en suero de IL-6, TNF-alfa e INF-gamma, para lo cual se utilizaron kits comerciales de la marca ENDOGEN (No. catálogo: EM-IL6, EM-TNFA y EM2-IFNG respectivamente, Ma. USA).

5.4 EVALUACION HISTOPATOLOGICA. Al final del estudio se realizaron necropsias de cada grupo, las patas de los ratones se fijaron en formol neutro. A las 24 hrs se cambió la solución de formol. La descalcificación se llevó a cabo en una solución ácido fórmico-formol durante 4 días. Las patas se enjuagaron en agua corriente durante 1 día. Posteriormente se procesaron en un Histoquinet Autotechnicon (N.Y. USA) para incluir en parafina y se hicieron cortes en un microtomo tipo Minot Spencer (N.Y. USA) con secciones de 5-7 μ m de grosor. Posteriormente se hicieron tinciones con hematoxilina-eosina. Los cortes

histológicos de las articulaciones de las 4 patas se evaluaron para la presencia o ausencia de las siguientes características:

- a) Sin lesión
- b) Inflamación de la membrana sinovial
- c) Hiperplasia de la membrana sinovial
- d) Formación de pannus
- e) Erosión de cartílago
- f) Destrucción de hueso (Hom, 1988).

6. ANALISIS ESTADISTICO:

Se realizaron las pruebas de χ^2 para determinar si existía diferencia significativa en el efecto que inducen los distintos tratamientos para cada grupo de ratones.

RESULTADOS

1. **ARTRITIS ACTIVADA POR ADYUVANTE.** En el grupo de ratones inoculados con ACF, se observó que el 100% de los animales desarrolló artritis, *caracterizada por inflamación y eritema, principalmente en las articulaciones de las patas posteriores.* Además se observó que a partir de las 12 semanas de edad, los ratones desarrollaron crecimiento de los ganglios de todo el cuerpo con un aumento de 20-30 veces su tamaño normal (fig. 1 A, B y C). El estudio histopatológico de las articulaciones reveló que todos los animales incluidos en este grupo desarrollaron artritis (fig. 2 A y B, 3 A, B y C), en los cuales se observó como daño mínimo la proliferación de la membrana sinovial (3/12 animales) y como máximo, la erosión de hueso (5/12 animales). El resto de los animales del grupo desarrollaron pannus y erosión de cartilago. Además se observó que el daño articular que presentó el grupo control de los ratones seniles fue muy similar. Del grupo de ratones que no recibieron tratamiento, únicamente 1/13 animales desarrollaron erosión de hueso; mientras que 4/13 permanecieron sin daño articular. La diferencia entre el grupo de ratones con artritis activada por adyuvante y ratones sin tratamiento resultó estadísticamente significativa con un valor de $p < 0.01$. En el grupo de ratones que además de recibir ACF recibió ciclofosfamida, el máximo grado de daño desarrollado fue la formación de pannus (1/8 animales); el resto se quedaron con inflamación y/o proliferación de la membrana sinovial y 1/8 animales no desarrolló artritis (Tabla I y fig. 4). Este grupo de ratones también resultó diferente de los otros grupos con una significancia estadística de $p < 0.01$. Además del daño articular, en algunos ratones seniles y en algunos con artritis

activada por adyuvante, se encontraron nódulos reumatoideos en tejido periarticular, vasculitis en la membrana sinovial, vasculitis coronaria y vasculitis renal (fig. 5 A-D). En los resultados que se encuentran en las tablas se observa una diferencia en el número de animales reportado y el número con el cual se iniciaron los experimentos; esto se debe a que algunos ratones murieron antes de terminar el estudio.

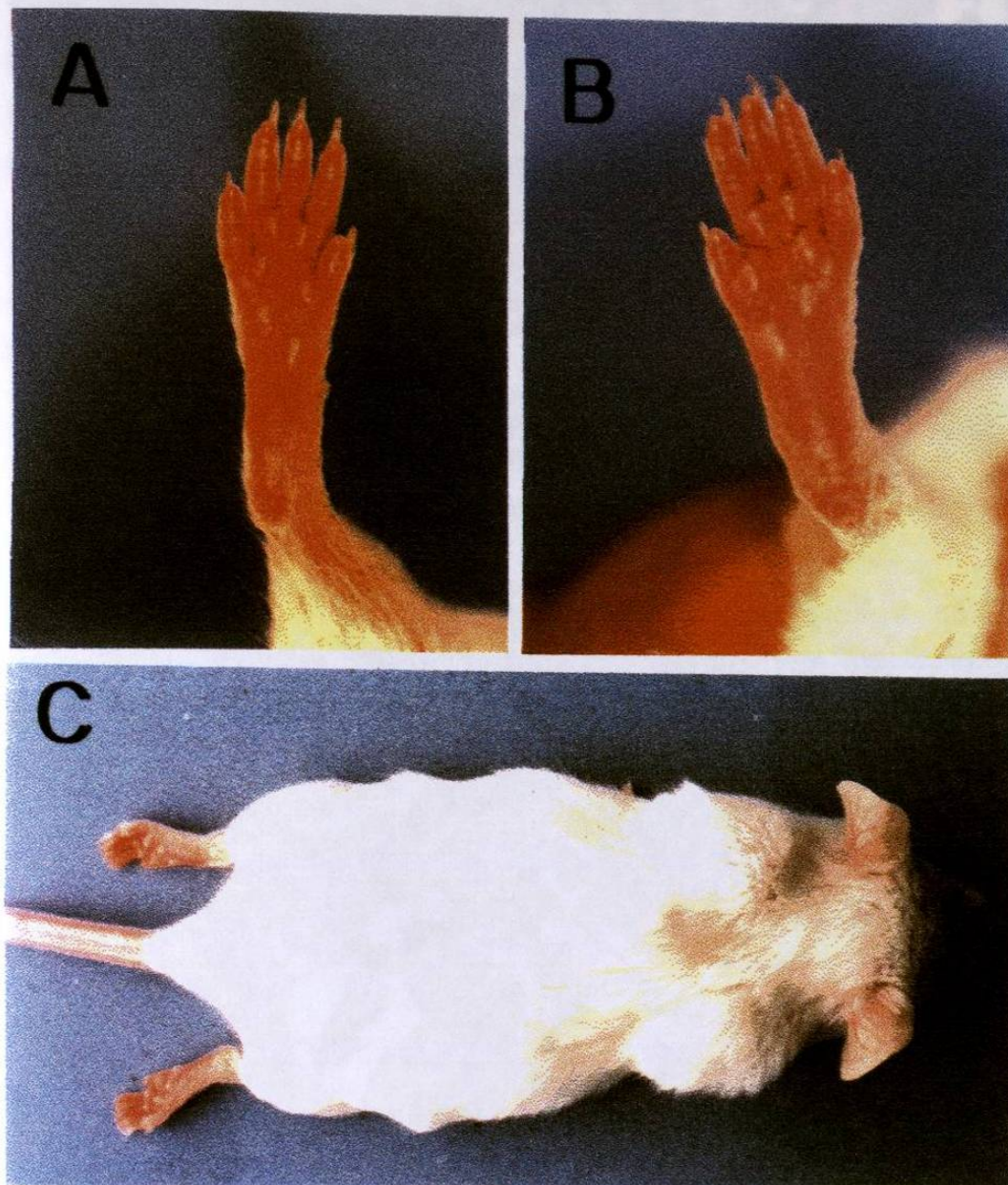


Figura 1. Evaluación clínica de la artritis activada por adyuvante en el ratón MRL/lpr. A. Ratón control sin tratamiento, B. Ratón con artritis activada por adyuvante donde se puede apreciar el eritema y la inflamación y C. Ratón con artritis activada por adyuvante con crecimiento de los ganglios, característica propia de esta cepa a las 12 semanas de edad.

Figura 2. Microfotografía de la articulación tibio-femoral en un ratón de la cepa MRL/lpr. A. Articulación sin daño; B. Articulación con artritis. Cortes de 5µm, tinción H y E. 16X.

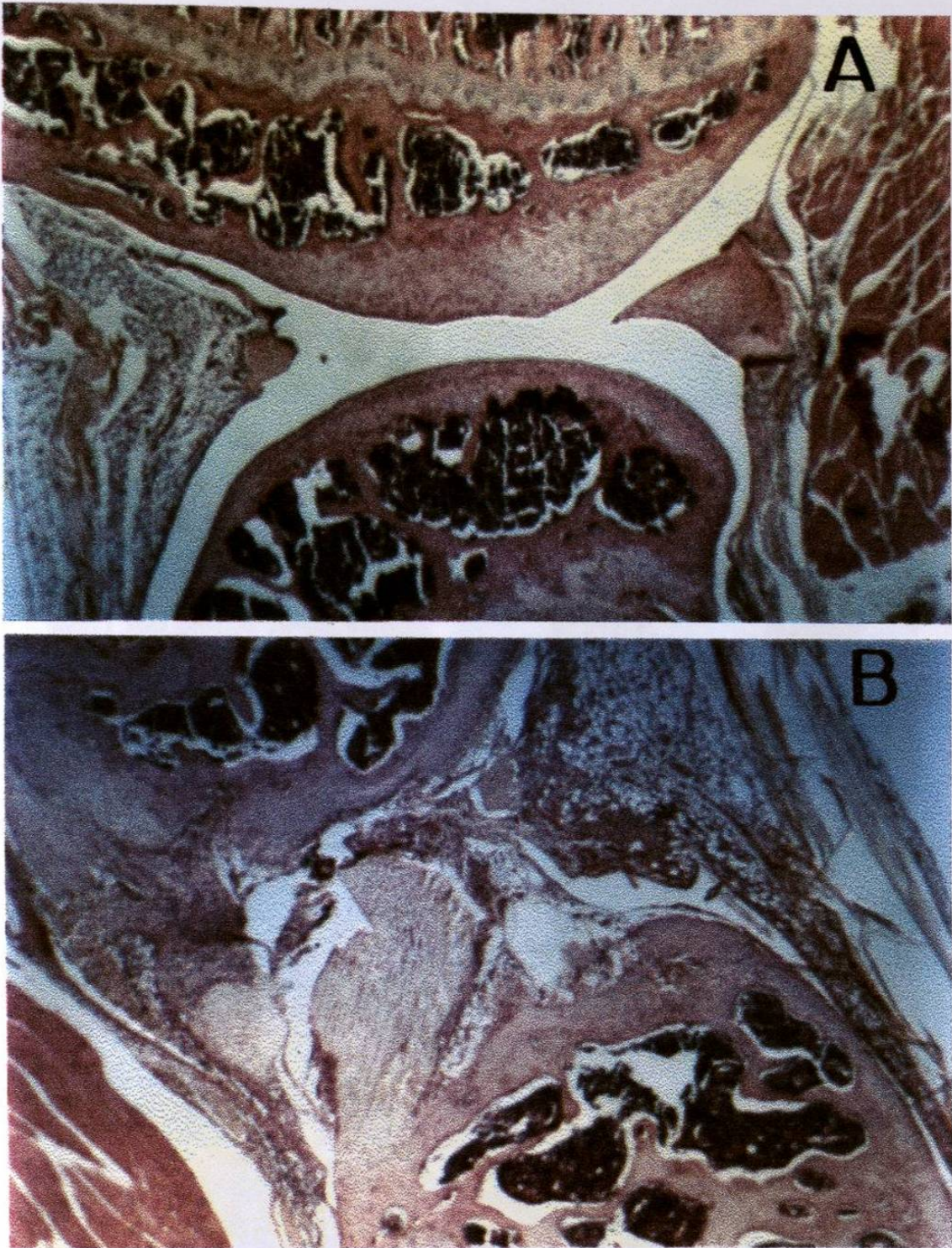


Figura 2. Microfotografía de la articulación tibio-femoral en un ratón de la cepa MRL/lpr. A. Articulación sin daño; B. Articulación con artritis. Cortes de 5 μ m, tinción H y E. 16X.

A. Infiltración de la membrana sinovial (6.5X); B. Proliferación de la membrana sinovial (16X); C. Formación de pannus con erosión de cartilago y erosión de hueso (16X). Cortes de 5 μ m, tinción H y E.

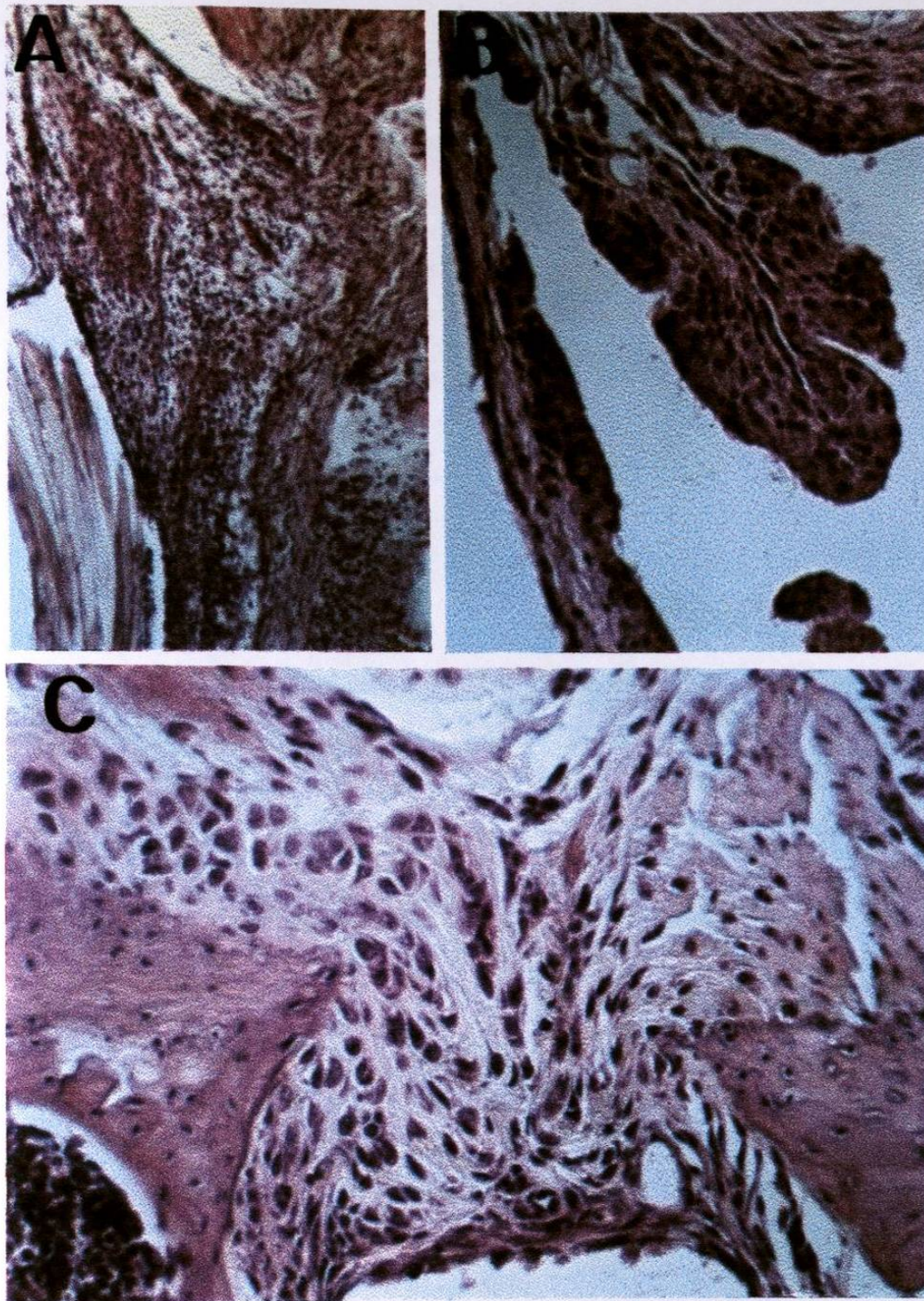


Figura 3. Microfotografía de las diferentes etapas de daño articular en ratones MRL/lpr con artritis activada por adyuvante y ratones seniles. A. Inflamación de la membrana sinovial (6.3X); B. Proliferación de la membrana sinovial (16X); C. Formación de pannus con erosión de cartílago y erosión de hueso (16X). Cortes de 5 μ m, tinción H y E.

TABLA I

HISTOPATOLOGIA DE LA ARTICULACION EN ARTRITIS ACTIVADA POR ADYUVANTE EN RATONES MRL/lpr.

CONDICION EXPERIMENTAL	GRADO DE DAÑO							MAXIMO GRADO DE DAÑO (%)
	SIN LESION	INFLAMACION DE LA SINOVIAL	PROLIFERACION DE LA SINOVIAL	PANNUS	EROSION DE CARTILAGO	EROSION DE HUESO		
SIN TRATAMIENTO	4/13	2/13	4/13	0/13	2/13	1/13	1/13 (8)	
SENILES	0/6	0/6	2/6	0/6	0/6	4/6	4/6 (66.6)	
ACF	0/12	0/12	3/12	3/12	1/12	5/12	5/12 (41.6)	
ACF + CF	1/8	2/8	4/8	1/8	0/8	0/8	0/8 (0)	

ACF= Adyuvante completo de Freund
 CF = Ciclofosfamida.

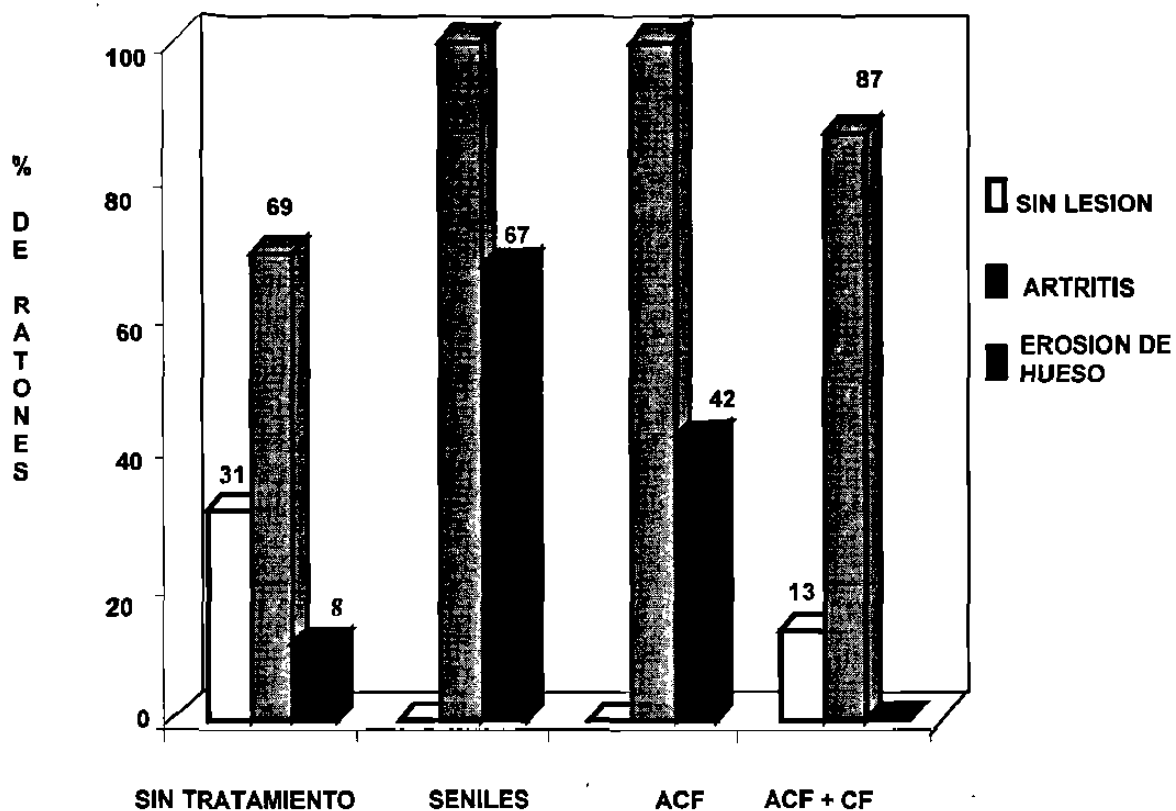


Figura 4. Histopatología de la articulación en ratones MRL/lpr sin tratamiento, con artritis activada por adyuvante, controles seniles y con artritis activada por adyuvante más ciclofosfamida.

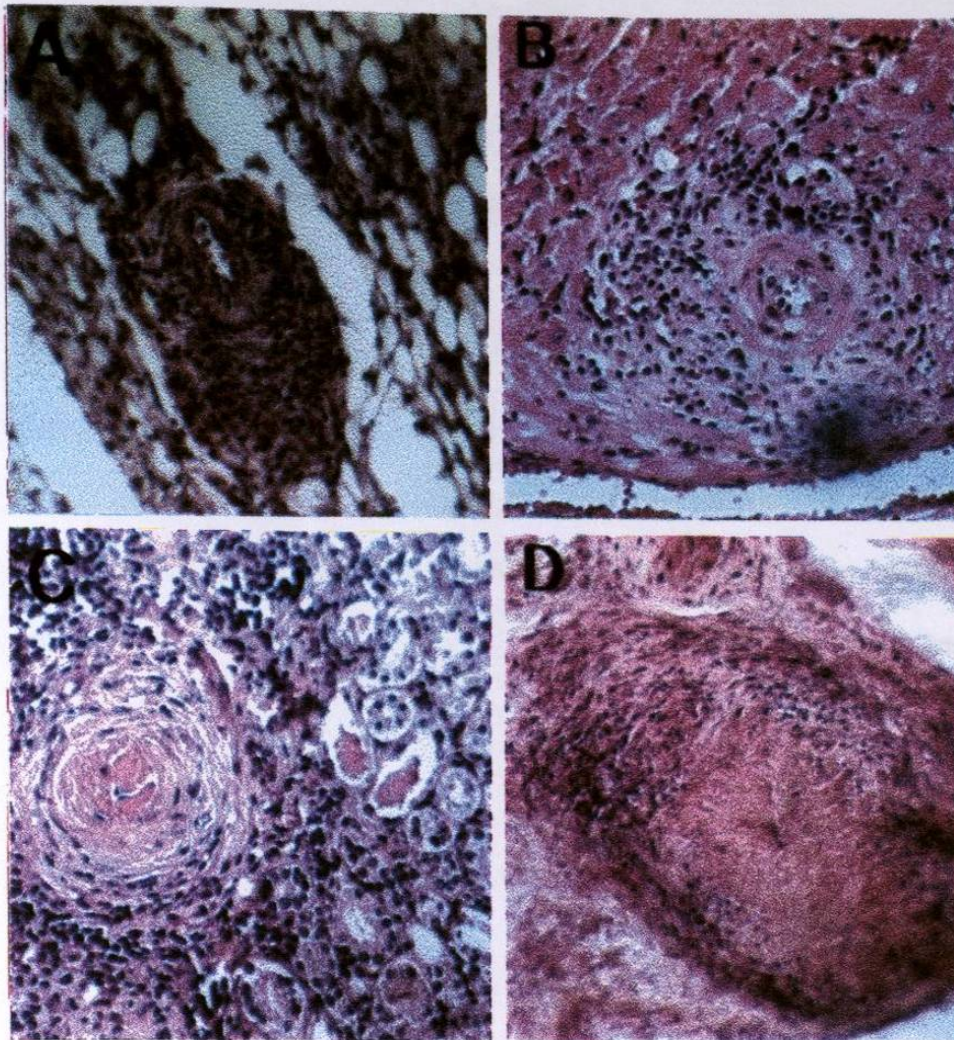


Figura 5. Microfotografía de las lesiones extra-articulares encontradas en la artritis activada por adyuvante y en la artritis espontánea (ratones seniles), en el ratón MRL/lpr. A. Vasculitis de la membrana sinovial; B. Vasculitis coronaria; C. Vasculitis renal y D. Nódulo reumatoideo en tejido periarticular. Cortes de $5\mu\text{m}$, tinción H y E. 16X.

2. ESTANDARIZACION DE LA DOSIS INFECTANTE DE BACTERIAS

EN EL RATON BALB/c. De las diferentes dosis de bacterias probadas en el ratón BALB/c se obtuvieron los siguientes resultados: para *Staphylococcus aureus* la dosis óptima fue 5×10^6 UFC/ 250 μ l; para *Nocardia brasiliensis*, 4×10^7 UFC /50 μ l y para *Streptococcus pneumoniae*, 3×10^6 UFC/50 μ l (Tabla II). Una vez que se encontró la dosis óptima infectante se probó en el ratón MRL/lpr. En el caso de *Staphylococcus aureus* y *Nocardia brasiliensis*, la dosis óptima en el ratón BALB/c fue equivalente en el ratón MRL/lpr. En el caso de *Streptococcus pneumoniae*, la dosis que resultó ser óptima para la infección del ratón BALB/c fue mortal para el ratón MRL/lpr, por lo que se probaron dosis de hasta 3×10^3 UFC/50 μ l, las cuales ocasionaron la muerte del animal. Con dosis por abajo de 3×10^3 UFC/50 μ l no fue posible demostrar la infección por hemocultivo.

TABLA II

DOSIS OPTIMA INFECTANTE DE BACTERIAS EN EL RATON BALB/c,
PROBADAS EN EL RATON MRL/lpr.

BACTERIA	DOSIS OPTIMA EN BALB/c	MRL/lpr
<i>Staphylococcus aureus</i>	5 X 10 ⁶ UFC/250 µl	5 X 10 ⁶ UFC/250 µl
<i>Nocardia brasiliensis</i>	4 X 10 ⁷ UFC/50 µl	4 X 10 ⁷ UFC/50 µl
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3 x 10 ⁶ UFC/50 µl	MORTAL*

* Dosis de hasta 3X10³ UFC/50µl ocasionaron la muerte del animal. Con dosis menores no fue posible demostrar la infección por hemocultivo.

3. ARTRITIS ACTIVADA POR ADYUVANTE MAS INFECCION POR

Staphylococcus aureus O *Nocardia brasiliensis*. En el grupo de ratones con artritis activada por adyuvante más infección, encontramos que en el caso de *Staphylococcus aureus*, se incrementó ligeramente el porcentaje de los animales que desarrollaron erosión ósea (máximo grado de daño), en relación al porcentaje de ratones con artritis activada por adyuvante; en cambio para *Nocardia brasiliensis* se observó una disminución mínima en erosión ósea. Sin embargo, estos resultados no fueron estadísticamente significativos (Tabla III y fig. 6).

TABLA III

HISTOPATOLOGIA DE LA ARTICULACION EN RATONES MRL/lpr CON ARTRITIS ACTIVADA POR ADYUVANTE MAS INFECCION CON *Staphylococcus aureus* O *Nocardia brasiliensis*.

CONDICION EXPERIMENTAL	GRADO DE DAÑO							MAXIMO GRADO DE DAÑO (%)
	SIN LESION	INFLAMACION DE LA SINOVIAL	PROLIFERACION DE LA SINOVIAL	PANNUS	EROSION DE CARTILAGO	EROSION DE HUESO		
ACF	0/12	0/12	3/12	3/12	1/12	5/12	5 / 12 (41.6)	
ACF + <i>S. aureus</i>	0/9	0/9	0/9	0/9	5/9	4/9	4/9 (44.4)	
ACF + <i>N.brasiliensis</i>	0/9	0/9	1/9	3/9	3/9	3/9	3 / 9 (33.3)	

ACF= Adyuvante completo de Freund.

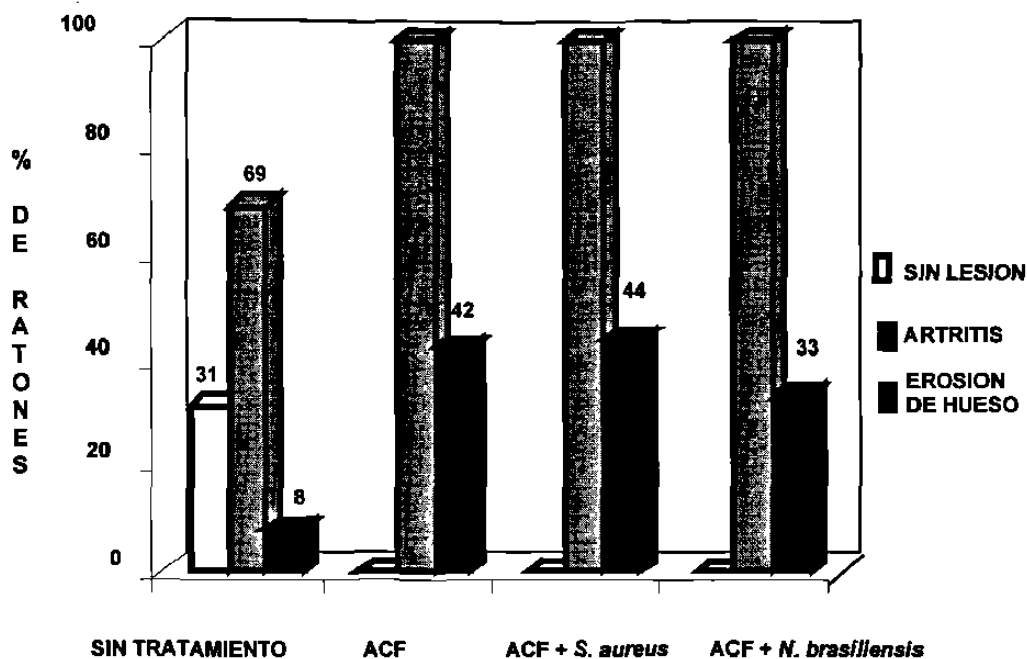


Figura 6. Histopatología de la articulación en ratones MRL/lpr con artritis activada por adyuvante más infección por *Staphylococcus aureus* o *Nocardia brasiliensis*.

4. RATONES MRL/lpr CON INFECCION POR *Staphylococcus aureus* O

Nocardia brasiliensis. En el grupo de ratones inoculados con *Staphylococcus aureus* se observó que el porcentaje de animales que desarrollaron erosión ósea aumentó a un 55.5% en relación al grupo de ratones sin tratamiento (12.5%) y al grupo con artritis activada por adyuvante; en el cual el máximo grado de daño ocurrió en un 41.6% de los animales incluidos. En el caso de los ratones inoculados con *Nocardia brasiliensis* ninguno de los animales desarrolló erosión ósea, y en solamente un 55.5% el daño evolucionó a erosión de cartilago. La diferencia entre los 2 grupos resultó estadísticamente significativa con una $p < 0.01$. (Tabla IV y fig. 7).

TABLA IV

HISTOPATOLOGIA DE LA ARTICULACION EN RATONES MRL/lpr INFECTADOS CON *Staphylococcus aureus* O *Nocardia brasiliensis*.

CONDICION EXPERIMENTAL	GRADO DE DAÑO							MAXIMO GRADO DE DAÑO (%)
	SIN LESION	INFLAMACION DE LA SINOVIAL	PROLIFERACION DE LA SINOVIAL	PANNUS	EROSION DE CARTILAGO	EROSION DE HUESO		
ACF	0/12	0/12	3/12	3/12	1/12	5/12	5 / 12 (41.6)	
<i>S. aureus</i>	0/9	0/9	0/9	2/9	2/9	5/9	5/9 (55.5)	
<i>N. brasiliensis</i>	0/9	0/9	2/9	2/9	5/9	0/9	0/9 (0)	

ACF = Adyuvante completo de Freund.

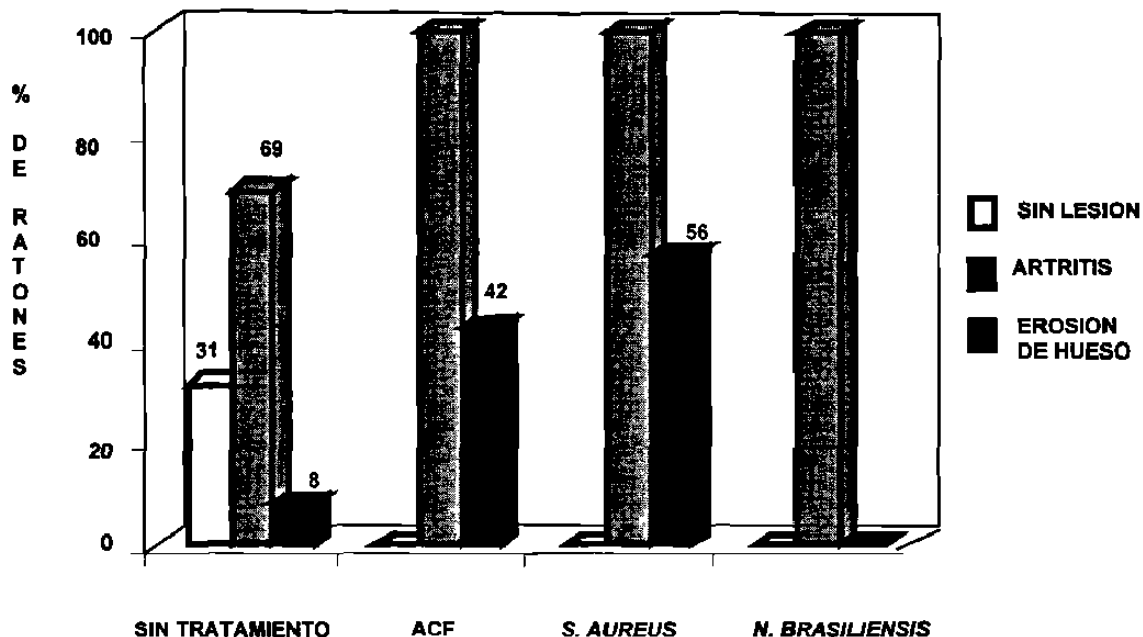


Figura 7. Histopatología de la articulación en ratones MRL/lpr que fueron infectados con *Staphylococcus aureus* o *Nocardia brasiliensis*.

5. RATONES MRL/lpr INMUNIZADOS CON POLISACARIDOS DE

Streptococcus pneumoniae. Los ratones inmunizados con una dosis de polisacáridos de neumococo desarrollaron un grado de daño histopatológico muy similar al que presentaron los ratones que recibieron ACF, sólo que en este grupo únicamente 1/5 animales (20%) desarrolló erosión de hueso. En los ratones que fueron inmunizados con 3 dosis de polisacáridos, 6/8 animales permanecieron sin ninguna lesión articular (75%); 1/8 desarrolló pannus y 1/8 desarrolló erosión de hueso (13%); estos resultados son estadísticamente diferentes a los que se obtuvieron en los ratones con una sola inmunización, y en los ratones que no recibieron tratamiento, con una $p < 0.01$ (Tabla V y fig. 8).

TABLA V

HISTOPATOLOGIA DE LA ARTICULACION EN RATONES MRL/pr INMUNIZADOS CON POLISACARIDOS DE NEUMOCOCO.

CONDICION EXPERIMENTAL	GRADO DE DAÑO							MAXIMO GRADO DE DAÑO (%)
	SIN LESION DE LA SINOVIAL	INFLAMACION DE LA SINOVIAL	PROLIFERACION DE LA SINOVIAL	PANNUS	EROSION DE CARTILAGO	EROSION DE HUESO		
ACF	0/12	0/12	3/12	3/12	1/12	5/12	5/12 (41.6)	
POLISACARIDOS (1 INMUNIZACION)	0/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5	1/5 (20)	
POLISACARIDOS (3 INMUNIZACIONES)	6/8	0/8	0/8	1/8	0/8	1/8	1/8 (12.5)	

ACF = Adyuvante completo de Freund.

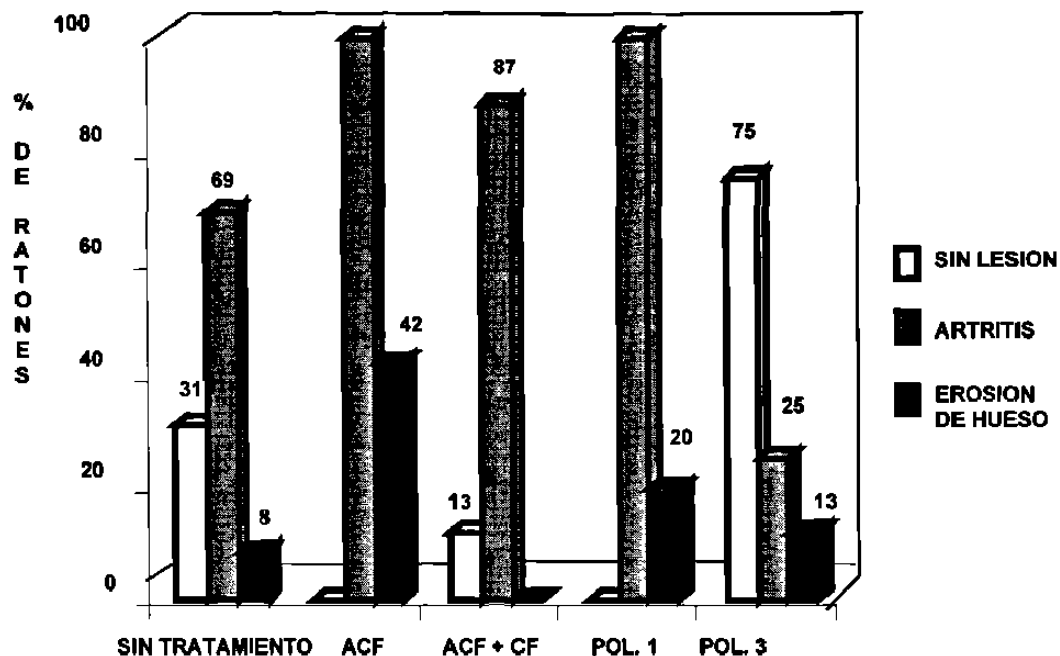


Figura 8. Histopatología de la articulación en ratones MRL/lpr inmunizados con una y tres dosis de polisacáridos de neumococo (POL.1 y POL.3 respectivamente).

6. DETERMINACION DE LOS NIVELES SERICOS DE IL-6, FNT-alfa e IFN-gamma. En los sueros de los ratones que fueron analizados para investigar la concentración de citocinas, no se observó una diferencia estadísticamente significativa con los distintos tratamientos que recibieron los ratones, por lo cual los resultados se organizaron de acuerdo al grado de daño histopatológico sin tomar en cuenta el grupo al que pertenecían los ratones. Los resultados se encuentran en las fig. 9, 10 y 11 donde se observa que la concentración en suero para cada citocina no está relacionada con el daño histopatológico de los ratones.

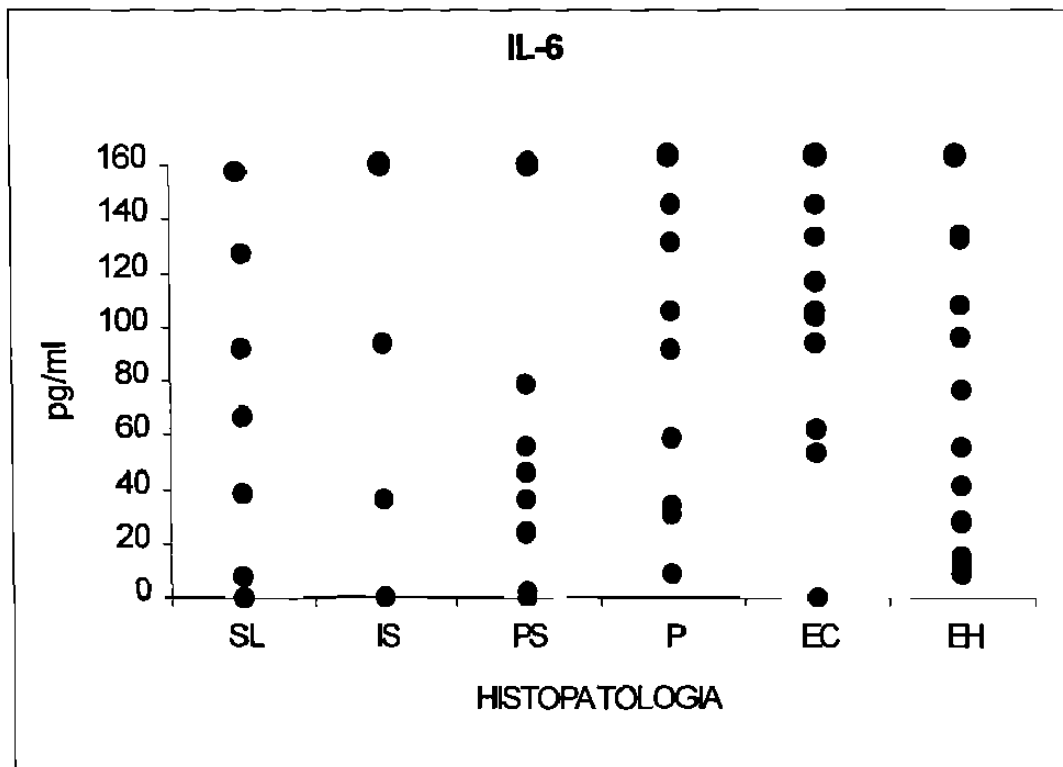


Fig. 9. Determinación de la concentración en suero de IL-6, al final del estudio, en los ratones MRL/lpr agrupados por grado de daño histopatológico: Sin lesión (SL); Inflamación de la membrana sinovial (IS); Proliferación de la membrana sinovial (PS); Formación de pannus (P); Erosión de cartílago (EC) y Erosión de hueso (EH).

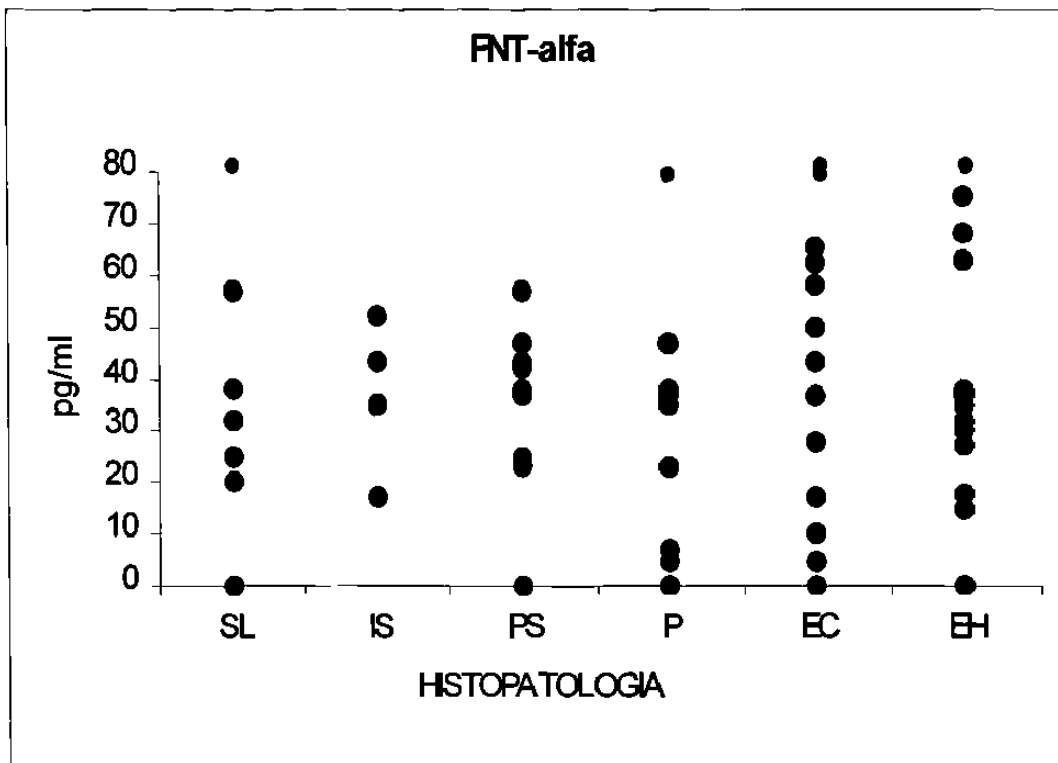


Fig. 10. Determinación de los niveles de FNT-alfa en suero, al final del estudio, en los ratones MRL/lpr agrupados por grado de daño: Sin Lesión (SL); Inflamación de la membrana sinovial (IS); Proliferación de la membrana sinovial (PS); Formación de pannus (P); Erosión de cartílago (EC); Erosión de hueso (EH).

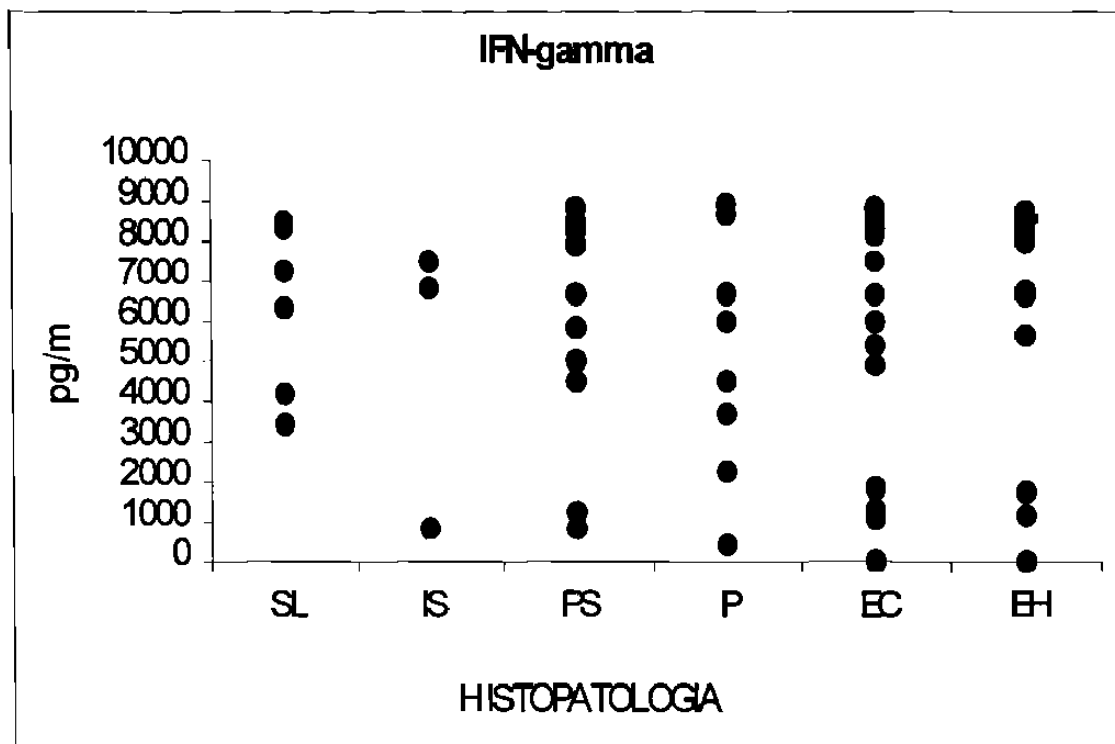


Fig. 11. Determinación de la concentración en suero de IFN-gamma, al final del estudio, de los ratones MRL/lpr agrupados por grado de daño: Sin lesión (SL); Inflamación de la membrana sinovial (IS); Proliferación de la membrana sinovial (PS); Formación de pannus (P); Erosión de cartilago (EC); Erosión de hueso (EH).

DISCUSION

La progresión natural de la artritis consta de 3 fases: activación, automantenimiento y destrucción tisular. En la fase de activación se produce un estado inflamatorio no específico, debido a la liberación de citocinas pro-inflamatorias por las células del tejido sinovial y del endotelio; las cuales activan a monocitos y células presentadoras de antígeno para montar una respuesta inmune, en la que ocurre nuevamente liberación de mediadores solubles (FNT, IL-1 e IL-6). Estas citocinas activan a macrófagos y células dendríticas para la presentación de péptidos propios a células TCD4+ (fase de automantenimiento). Las células TCD4+ a su vez liberan citocinas (IFN e IL-6) que activan a células B para su diferenciación y producción de autoanticuerpos como el FR. Estas inmunoglobulinas forman complejos inmunes que se depositan en la membrana sinovial y estimulan la activación y la proliferación de las células de la sinovia; así como la liberación de citocinas y enzimas, que conducen a la fase de destrucción en la que se produce erosión de cartílago y hueso (Lipsky, 1998). Al igual que la mayoría de las enfermedades autoinmunes, se piensa que la AR es producida por una interacción entre factores genéticos y ambientales tales como los agentes infecciosos (Wilder, 1991; Moreland, 1991 y Thompson, 1994).

En el presente trabajo uno de los objetivos fue reproducir el modelo de artritis activada por adyuvante en el ratón MRL/lpr (Ratkay, 1993). Se tomó como punto de comparación los resultados obtenidos con ratones seniles, con ratones sin

tratamiento y con ratones que recibieron ACF y posteriormente ciclofosfamida. De nuestros resultados observamos que en los ratones jóvenes sin tratamiento, el 69% desarrolló artritis y de ellos, solamente un 8% avanzó hasta la etapa de máximo grado de daño que es la erosión de hueso. Esto es similar a lo reportado por Ratkay en el grupo control de su modelo (Ratkay, 1993). Por otra parte, del grupo de ratones inoculados con ACF, al igual que los ratones seniles, el 100% de los animales desarrollaron artritis y un 42% llegó a presentar erosión de hueso; en el caso de los ratones seniles, el 67% desarrolló el máximo daño. En comparación con el modelo de Ratkay, sólo un 82% de los animales desarrolló artritis, de los cuales, un 43% presentó erosión de hueso. La diferencia de nuestros resultados con 100% de artritis activada por adyuvante y el 82% reportado por Ratkay puede deberse al tipo y a la cantidad de los microorganismos presentes en el medio ambiente en el que permanecen los ratones el tiempo que dura el experimento. De hecho está reportado que los ratones MRL/lpr no desarrollan la enfermedad en un ambiente gnbiótico (comunicación personal de Ratkay), además de las observaciones de Taurog en ratas transgénicas (HLA-B27) en las cuales la artropatía espontánea es más atenuada en aquellos animales que crecen en un ambiente libre de gérmenes (Taurog, 1994). Al parecer las micobacterias que contiene el ACF tienen actividad policlonal y participan en la fase de activación y automantenimiento de la enfermedad, ya que favorecen el proceso inflamatorio inespecífico y la presentación de péptidos propios por macrófagos a células TCD4+, a través de mimetismo molecular (Porcelli, 1993).

De los resultados obtenidos en los ratones inoculados con ACF y posteriormente con ciclofosfamida, observamos que un 87% desarrollaron daño articular, de los cuales ninguno presentó erosión de cartílago o de hueso. Esto puede ser debido a que este medicamento protege a los animales del daño más grave; probablemente a nivel de la etapa de automantenimiento o de destrucción tisular, en donde ocurre la activación y diferenciación de células T y células B, las cuales constituyen un blanco importante cuando se utilizan dosis altas de ciclofosfamida.

En los ratones MRL/lpr en los cuales se administraron las dosis óptimas para lograr la infección por *Staphylococcus aureus* o *Nocardia brasiliensis*, previamente estandarizadas en el ratón BALB/c, se observó que estas mismas dosis resultaron infectantes. La infección se puso de manifiesto con el desarrollo de un absceso de 4-6 mm de diámetro, el cual apareció a los 2 días de la inmunización con los 2 tipos de bacterias. Para *Nocardia brasiliensis* el ratón BALB/c desarrolló el absceso hasta después del séptimo día. Esto significa que el ratón MRL/lpr es más susceptible a la infección por esta bacteria que el ratón BALB/c. Para los 2 tipos de bacterias los abscesos permanecieron visibles hasta el día en que los animales fueron sacrificados; esto nos ayudó a asegurar que la infección estuvo presente el durante todo el estudio. En el caso de la infección por *Streptococcus pneumoniae*, la dosis que resultó óptima para la infección del ratón BALB/c, fue letal para el ratón MRL/lpr, por lo que hubo necesidad de estandarizar la infección en esta cepa. Sin embargo, en las dosis que ya no provocaron la muerte de los animales no se pudo demostrar la infección por hemocultivo. Esto puede ser debido a que el

ratón MRL/lpr es más susceptible a la infección por el *Streptococcus pneumoniae*.

Con relación a los resultados obtenidos con los ratones en los que se quiso investigar el efecto de la infección bacteriana en la artritis activada por adyuvante, observamos que ni el *Staphylococcus aureus* ni la *Nocardia brasiliensis* fueron capaces de ejercer algún cambio estadísticamente significativo en la evolución del daño histopatológico de la enfermedad activada por ACF. Lo anterior puede ser debido a que la respuesta inmune primaria que se produce contra *Staphylococcus aureus* o *Nocardia brasiliensis*, favorece el desencadenamiento de la enfermedad en forma similar a lo que sucede en el grupo de ratones que únicamente recibieron ACF; el cual es capaz de activar la artritis hasta su máximo grado de daño. (Tar, 1985; Baum 1993).

En los ratones MRL/lpr, en los que se investigó el efecto de la infección bacteriana en el desarrollo de la artritis espontánea, se observó que el *Staphylococcus aureus* activó la enfermedad en forma temprana en el 100% de los animales. De estos, un 44% desarrolló erosión de hueso, lo cual es muy similar a los resultados obtenidos con ACF. En cambio *Nocardia brasiliensis*, aunque también fue capaz de favorecer la artritis temprana en el 100% de los ratones infectados, en ninguno de ellos provocó evolución del daño hasta la etapa de erosión de hueso.

Es probable que la infección por *Staphylococcus aureus* contribuya a la activación de la enfermedad al participar en la fase de inflamación no específica. Posteriormente cuando se monta una respuesta inmune hacia epítopes proteicos presentados a células TCD4+ se favorece, por mimetismo

molecular (Porcelli, 1993), la presentación de péptidos propios y de esta forma se desencadena el proceso de autoinmunidad y el daño articular (Deleuran, 1992), como sucede para ACF.

Por otra parte, la infección por *Nocardia brasiliensis* quizá también participa en la fase de inflamación no específica, pero una vez que los macrófagos ingieren a este microorganismo intracelular, probablemente se inicia la presentación de epítopes lipídicos a células TCD8+ citotóxicas en el contexto de moléculas CD1 (Pringozy,1997; Constant,1994). Esto da lugar a la liberación de citocinas, radicales de oxígeno y enzimas que finalmente lisan a las células parasitadas. Posteriormente se llevará a cabo el procesamiento y la presentación, por macrófagos, de epítopes proteicos a células TCD4+ y a células B, en el contexto de las moléculas de clase II del CMH. Consecuentemente se efectuará la producción de citocinas y anticuerpos, que darán lugar al proceso inflamatorio y erosivo característico de la enfermedad (Rico,1982). Esto implica que probablemente la activación inicial de las células TCD8+ retrase (con relación a lo observado para *Staphylococcus aureus*) el tiempo de evolución de la etapa erosiva de hueso de la artritis en el ratón MRL/lpr.

¿Es realmente el efecto de la infección lo que se observa en la evolución de la artritis espontánea en el ratón o es el efecto de los antígenos bacterianos?.

En los ratones inmunizados una sola vez con antígenos polisacáridos de neumococo encontramos que, al igual que el efecto producido por el ACF y las infecciones por las bacterias estudiadas, el 100% de los ratones incluidos en el

grupo desarrolló artritis, de los cuales sólo un 20% presentó *erosión de hueso*. En cambio en los ratones que recibieron 3 inmunizaciones con antígenos polisacáridos de neumococo, observamos que sólo un 25% de ellos desarrolló artritis, en donde un 13% evolucionó hasta la etapa de *erosión de hueso*; mientras que un 75% de los animales permanecieron sin ninguna lesión articular. La diferencia de este porcentaje de animales sin daño es estadísticamente significativa con relación al 31% de los ratones sin tratamiento que permanecen sin lesión histopatológica.

Estos resultados pueden ser debidos a que la reinmunización con antígenos polisacáridos, indujo tolerancia hacia los antígenos propios en células T (Mossier, 1982); probablemente a través de la producción de anticuerpos anti-idiotipo o de la activación de células T supresoras y que de esta forma se haya bloqueado el fenómeno de autoinmunidad en el ratón MRL/lpr. Por otra parte dada la naturaleza timo-independiente de los antígenos polisacáridos es probable que se hayan inactivado, por saturación de receptores, las células B que se activan en el proceso autoinmune (Mossier, 1982) y que de esta manera, en parte, se inhiba el daño tisular provocado por la producción de FR y el depósito de complejos inmunes.

El curso clínico de la enfermedad depende en gran manera de las características cualitativas de la respuesta inmune: esto es, si se monta una respuesta de tipo humoral o celular; si se activan células T, las cuales abundan en este modelo animal (Hammond, 1993 y Tarkowsky, 1987); si son cooperadoras, supresoras y del tipo de citocinas predominantemente producidas (Tar, 1985). Una forma de comprobar la validez de estas teorías

consistiría en analizar inmunohistoquímicamente las clonas de células T presentes en la membrana sinovial a diferentes tiempos durante el establecimiento de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en los ratones reinmunizados con polisacáridos de neumococo abren una línea de trabajo para estudiar más específicamente su efecto protector en el desarrollo de la enfermedad; cuál o cuáles de los 23 polisacáridos contenidos en la vacuna Pneumovax es o son los responsables de este resultado, en qué dosis y si el efecto protector es definitivo o solamente retrasa la evolución de la enfermedad. Además nos motiva a investigar un poco más acerca del diseño de vacunas con componentes microbianos que induzcan tolerancia en células TCD4+, las cuales son esenciales para la progresión del proceso inflamatorio de la artritis (Lipsky, 1998).

Para investigar si existía alguna relación entre el daño histopatológico de la enfermedad y el nivel en suero de las citocinas proinflamatorias, se midió la concentración del FNT-alfa, IL-6 e IFN-gamma al tiempo en que los ratones fueron sacrificados. En los resultados no se encontró relación directa ni inversa entre el grado de daño y la concentración de estas citocinas en el ratón MRL/lpr. Estos resultados difieren de lo reportado por Westacott y Feldmann en 1990 quienes indican que los niveles locales y sistémicos de estas citocinas proinflamatorias corresponden a la actividad de la AR en el humano. Nosotros consideramos que es necesario investigar por métodos inmunohistoquímicos a nivel articular la presencia de estas citocinas en este modelo, en particular para saber si existe o no alguna relación de su concentración con la histopatología de la enfermedad.

Este trabajo se realizó con el propósito de conocer el efecto de la infección bacteriana en la inducción de actividad o remisión de la enfermedad en este modelo animal. Además de tratar de explicar los eventos que se producen en la AR en el humano, tomando en cuenta que la artritis que este modelo desarrolla guarda mucha similitud con esta última.

Aún cuando es muy amplio el conocimiento de la epidemiología, inmunología y de los aspectos genéticos de la AR, no se tiene una idea clara de qué es lo que inicia o perpetúa el proceso. Hasta que la causa sea conocida, la AR no podrá ser definida en forma precisa. Puede tratarse de una enfermedad con más de una causa o más de una enfermedad con una sola causa.

CONCLUSIONES

1. En la artritis activada por adyuvante, la infección por *Staphylococcus aureus* o por *Nocardia brasiliensis* no modifica la evolución clínica de la enfermedad ya establecida.
2. La infección por *Staphylococcus aureus* desencadena artritis temprana en forma similar a la aplicación de ACF en el ratón MRL/lpr.
3. La infección por *Nocardia brasiliensis* desencadena artritis temprana en el ratón MRL/lpr, pero limita el grado de daño.
4. La reinmunización con antígenos polisacáridos de neumococo disminuye significativamente el número de ratones MRL/lpr que desarrolla artritis en forma natural.
5. La concentración de IL-6, FNT-alfa e IFN-gamma en suero no están relacionada con el daño histopatológico de la artritis en el ratón MRL/lpr.

BIBLIOGRAFIA

Abe,C. and Shiokawa, Y. 1981. Spontaneous Polyarthritits in MRL/l Mice. In New Horizons in Rheumatoid Arthritis. Shiokawa, Y., Abe, T. and Yamauchi, Y. eds. Excerpta Medica, NY, International Congress Series no. 535, p. 116.

Andrews, B.S., Eisenberg, R.A., Theofilopoulos, A.N., Izui, S., Wilson, C.B., Mc Conahey,P.J., Murphy, E.D., Roths, J.B. and Dixon,F.J. 1978 Spontaneous Murine Lupus-Like Syndromes. Clinical and Immunopathological Manifestations in Several Strains. J.Exp. Med. 148: 1198-1215.

Barnes, C.G. 1970. An Introduction to Clinical Rheumatology, Mason, McCurrey H.L.F., Londres, Pitman Medical Scientific, p. 11-51.

Baum, H., Butler, P., Davies, H., Sternberg, M.J.E., Burroughs, A.K. 1993. Autoimmune Disease and Molecular Mimicry: An Hypothesis. Trends. Biochem. Sci. 18: 140-144.

Behar,S.M. and Porcelli, S.A. 1995. Mechanisms of Autoimmune Disease Induction. The Role of the Immune Response to Microbial Pathogens. Arthritis Rheum. 38: 458-476.

Bouvet, J.-P. Couderc,J.,Bouthillier,Y.,Franc,B., Ducaillar, A. and Mouton,D. 1990. Spontaneous Rheumatoid-Like Arthritis in a Line of Mice Sensitive to Collagen-Induced Arthritis. Arthritis Rheum 33:1716-1722.

Brennan, F.M., Chantry, D., Jackson, A., Maini, R.N., and Feldmann, M. 1989. Inhibitory Effect of TNF α Antibodies on Synovial Cell Interleukin-1 Production in Rheumatoid Arthritis. Lancet 65 ii: 244-247.

Brostoff, J., Scadding, G.K., Male, D., Roitt, I.M. 1994. Artritis Reumatoide y Otras Enfermedades Articulares. *En* Inmunología Clínica. Brostoff, J., Scadding, G.K., Male, D., Roitt, I.M. eds. Mosby/Doyma. p. 5.1-5.15.

Bunce, C., Wheeler, L., Reed, G., Musser, J. and Barg, N. 1992. Murine Model of Cutaneous Infection with Gram-Positive Cocci. *Infect. Immun.* **60**: 2636-2640.

Calin, A. 1979. Keratoderma Blennorrhagica and mucocutane on Manifestations of Reiter's Syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* **38** suppl. 68-72.

Cassali, P., Burastero, S.E., Nakamura, M., Inghirami, G. and Notkins, A.L. 1987. Human Lymphocytes Making Rheumatoid Factor and Antibody to Belong to Leu-1+B Cell Subset. *Science.* **236**: 77-81.

Constant, P., Davodeau, F., Peyrat, M.A., Poquet, Y., Puzo, G., Boneville, M., Fournié, J.J. 1994. Stimulation of Human γ δ T Cells by non Peptidic Mycobacterial Ligands. *Science.* **264**: 267-270.

Cromartie, W.J., Craddock, J.G., Schwab, J.H., Anderie, S.K. and Yang, C.H. 1977. Arthritis in Rats After Systemic Injection of Streptococcal Cells or Cell walls. *J. Exp. Med.* **146**: 1585.

Damian, R.T. 1964. Molecular Mimicry: Antigen Sharing by Parasite and Host and its Consequences. *Am. Naturalist.* **98**: 129-149.

Deleuran, B.W., Chu, C.Q., Field, M., Brennan, F.M., Katsiki, P., Feldmann, M., Maini, R.N. 1992. Localization of Interleukin-1 α , Type 1 Interleukin-1 Receptor and Interleukin-1 Receptor Antagonist in the Synovial Membrane and Cartilage/Pannus Junction in Rheumatoid Arthritis. *Br. J. Rheumatol.* **31**: 801-809.

Dingle, J.T., Page Thomas, D.P., Hazleman, B. 1987. The Role of Cytokines in Arthritic Diseases: In Vitro and in Vivo Measurements of Cartilage Degradation. *Int. J. Tissue React.* **9**: 349-354.

Eastgate, J.A., Symons, J.A., Wood, N.C., Grinlinton, F.M., Di Giovine, F.S., Duff, G.W. 1988. Correlation of Plasma Interleukin 1 Levels with Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. *Lancet.* **24** ii: 706-709.

Edwards, J.C., Cooke, W.A., Moore, A.R., Collins, C., Hay, F. and Willoughby, D.A. 1986. Connective Tissue Abnormalities in MRL/l Mice. *Ann. Rheum. Dis.* **45**: 512.

Eisenberg, R.A., Thor, L.T. and Dixon, F.J. 1979. Serum-Serum Interactions in Autoimmune Mice. *Arthritis Rheum.* **22**: 1074.

Farahat, M.N., Yanny, G., Poston, R., Panayi, G.S. 1993. Cytokine Expression in Synovial Membranes of Patients with Rheumatoid Arthritis and Osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **52**: 870-875.

Feldmann, M., Brennan, F.M., Chantry, D., Haworth, C., Turner, M., Abney, E., Buchan, G., Barret, K., Barkley, D., Chu, A., Field, M., Maini, R.N. 1990. Cytokine Production in the Rheumatoid Joint: Implications for Treatment. *Ann. Rheum. Dis.* **49**: 480-486.

Friedman, M.S., Posnett, D.N., Tumang, J.R., Cole, B.C. and Crow, M.K. 1991. A Potential Role for Microbial Superantigens in the Pathogenesis of Systemic Autoimmune Disease. *Arthritis Rheum.* **34**: 468-480.

Gay, S., O'Sullivan, F.X., Gay, E. and Koopman, W.J. 1987. Humoral Sensitivity to Native Collagen Types I-VI in The Arthritis of MRL/lpr Mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **45**: 63.

Glasser, R.M., Mahon, C.A., Marshak-Rothstein, A. 1992. Persistence of Ipr/Ipr- Derived IgG2a Secreting B Cells in Normal-Ipr/Ipr Adult Radiation Chimeras or Ipr/Ipr-Normal Kidney Capsule Chimeras. *Cell. Immunol.* **142**: 313-325.

Goldenberg, D.L. 1983. "Postinfectious" Arthritis: New Look at an Old Concept with Particular Attention to Disseminated Gonococcal Infection. *Am. J. Med.* **74**: 925-928.

Goldstein, R. and Karsh, J. 1986. In Vitro Synthesis of IgM Rheumatoid Factor in Response to *Staphylococcus aureus*, by Lymphocytes from Healthy Adults. *Arthritis Rheum.* **29**:1440-1445.

Goverman, J., Woods, A., Larson, L., Weiner, L., Hood, L. Zaller, D.M. 1993. Transgenic Mice that Express a Myelin Basic Protein-Specific T Cell Receptor Develop Spontaneous Autoimmunity. *Cell.* **72**: 551-560.

Granfors, K. 1992. Do Bacterial Antigens Cause Reactive Arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* **18**: 37-48.

Guerne, P.A., Carson, D.A. and Lotz, M. 1990. IL-6 Production by Human Articular Chondrocytes: Modulation of its Synthesis by Cytokine, Growth Factors, and Hormones in Vitro. *J. Immunol.* **144**: 499-505.

Guerne, P.A. , Zuraw, B.L., Vaughan, J.H., Carson, D.A. and Lotz, M. 1989. Synovium as a Source of Interleukin 6 in Vitro: Contribution to Local and Systemic Manifestations of Arthritis. *J. Clin. Invest.* **83**: 585-592.

Halberg, P., Lawrence, D.R., Gordon, D.A. and Hastings, D.E. 1994. Rheumatoid Arthritis *in Rheumatology.* Klippel, J.H. and Dieppe, P.A. eds. Mosby Yearbook Europe Limited. p. 2.1-4.13.

Halbert, S.P., Karsh, J., Anken, M. 1980. Quantitative Enzyme Immunoassay for IgM Rheumatoid Factor Using Human Immunoglobulin G as Substrate. *Am. J. Clin. Pathol.* **74**: 776-784.

Hammer, R.E., Maika, S.D., Richardson, J.A., Tang, J-P., Taurog, J.D. 1990. Spontaneous Inflammatory Disease in Rats Expressing HLA-B27 and Human β 2-m: an Animal Model of HLA-B27-Associated Human Disorders. *Cell.* **63**: 1099-1112.

Hammond, D.M., Nagarkatti, P.S., Gote, L.R., Seth, A., Hassuneh, M.R., Nagarkatti, M. 1993. Double-Negative T Cells from MRL-lpr/lpr Mice Mediate Cytolytic Activity When Triggered Through Adhesion Molecules and Constitutively Express Perforin Gene. *J. Exp. Med.* **178**: 2225-2230.

Hang, L., Aguado, M.T., Dixon, F.J. and Theofilopoulos, A.N. 1985. Induction of Severe autoimmune Disease in Normal Mice by Simultaneous Action of Multiple Immunostimulators. *J.Exp. Med.* **161**: 423.

Hang,L., Theofilopoulos,A.N. and Dixon,F.J. 1982. A Spontaneous Rheumatoid Arthritis-Like Disease in MRL/l Mice. *J.Exp.Med.* **155**: 1690-1701.

Haas, C., Bernhard, R. And Le Hir, M. 1997. IFN γ Is Essential for The Development of Autoimmune Glomerulonephritis in MRL/lpr Mice. *J. Immunol.***158**: 5884-5491.

Harris, E.D. 1993. Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis *In* *Texbook of Rheumatology*. 4^a Edition. Kelly, W., Harris, E.D., Ruddy, S. and Sledge, C.B. eds. W.B.Saunders Company. p. 833-865.

Hess, D.C., Taormina, M., Thompson, J., Sethi, K.D., Diamond, B., Rao, R., Chamberlain, C.R., Feldman, D.S. 1993. Cognitive and Neurologic Deficits in the MRL/lpr Mouse: A Clinicopathologic Study. *J. Rheumatol.* **20**: 610-607.

Hirohata, S., Inoue, T., Ito, T. 1992. Development of Rheumatoid Arthritis after Chronic Hepatitis Caused by Hepatitis C Virus Infection. *Intern. Med.* **31**: 493-495.

Hom, J., Bendele, A.M. and Carlson, D.G. 1988. In Vivo Administration with IL-1 Accelerates the Development of Collagen-Induced Arthritis in Mice. *J. Immunol.* **141**: 834.

Innman, R.D. 1992. The Role of Infection in Chronic Arthritis. *J. Rheumatol. Supp.* **33**: 98-104.

Izui, S., and Eisenberg, R.A. 1980. Circulating anti-DNA Rheumatoid Factor Complexes in MRL/lpr Mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **15**: 536.

Jarret, M.P., Moses, S., Barland, P., Miller, M.H. 1980. Articular Complications of Meningococcal Meningitis: An Immune Complex Disorder. *Arch. Intern. Med.* **140**: 1665-1666.

Kaufmann, SHE. 1993. Immunity to Intracellular bacteria. *Annue. Rev. Immunol.* **11**: 129-63.

Kelley, V.E. and Roths,J.B. 1982. Increase in Macrophage Ia expression in Autoimmune Mice: Role of the lpr Gene.*J. Immunol.* **129**: 923-925.

Kennedy-Stoskopf, S. 1989. Pathogenesis of Lentivirus Induced Arthritis: A Review. *Rheumatol. Int.* **9**: 129-136.

Killar, L.M. and Dunn, C.J. 1989. Interleukin-1 Potentiates the Development of Collagen-Induced Arthritis in Mice. *Clin. Sci.* **76**: 535.

Kim, C., Siminovitch, K.A., Ochi, A. 1991. Reduction of Lupus Nephritis in MRL/lpr Mice by a Bacterial Superantigen Treatment. *J. Exp. Med.* **174**: 1431-1437.

Klinman, D.M., Dellacqua, D.K., Conover, J., Huppi, K. 1993. VH Family Utilization by IgG anti-DNA-Secreting Lymphocytes Derived From Autoimmune MRL-lpr/lpr Mice. *Arthritis and Rheum.* **36**: 561-568.

Knight, B., Katz, D.R., Isenberg, D.A., Ibrahim, M.A., Lepage, S., Hutchings, P., Swartz, R.S. and Cooke, A. 1992. Induction of Adjuvant Arthritis in Mice. *Clin. Exp. Immunol.* **90**: 459.

Lauhio, A., Leirisalo-Repo, M., Lähdevirta, J., Saikku, P., Repo, H. 1991. Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Three Month Treatment with Limecycline in Reactive Arthritis, with Special Reference to Chlamydia Arthritis. *Arthritis Rheum.* **34**: 6-14.

Levine, J., Hartwell, D., Beller, D.I. 1991. Imbalanced Cytokine Production by Macrophages from Autoimmune-Prone Mice. *Immunol. Lett.* **30**: 183-192.

Lipsky, P.E. and Davis, L.S. 1988. The Central Involvement of T Cells in Rheumatoid Arthritis. *The Immunologist* **6**: 121-127.

MacDonald, H.R., Lees, R.K., Baschieri, S., Herrmann, T., Lussow, A.R. 1993. Peripheral T-cell Reactivity To Bacterial Superantigens in Vivo: The Response/Anergy Paradox. *Immunol. Rev.* **133**: 105-117.

McGuire, T.C., O' Rourke, K.I., Knowles, D.P., Cheevers, W.P. 1990. Caprine Arthritis Encephalitis Lentivirus Transmission and Disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **160**: 61-75.

Marrack, P., Kappler, J. 1990. The Staphylococcal Enterotoxins and Their Relatives. *Science.* **248**: 705-711.

Miethke, T., Wahl, C., Heeg, K., Echtenacher, B., Krammer, P.H., Wagner, H. 1992. T Cell Mediated Lethal Shock Triggered in Mice by the Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B: Critical Role of Tumor Necrosis Factor. *J. Exp. Med.* **175**: 91-98.

Moreland-L.W., Kootman, W.J. 1991. Infection as a Cause of Arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **3**: 639-49.

Mossier, D.E. and Subbarao. 1982. Thymus -independent antigens: Complexity of B Lymphocyte Activation revealed. *Immunology Today.* **3**: 217-222.

Murphy, E.D., and Roths, J.B. 1978. Autoimmunity and Lymphoproliferation: Induction by Mutant Gene *Ipr*, and Acceleration by a Male-Associated Factor in Strain BXSB Mice. *In Genetic Control of Autoimmune Disease.* Rose, N.R., Bigazzi, P.E. and Warner, N.L. Eds. Elsevier/North Holland, New York. p. 207-219.

Nakamura,K., Kashiwazaki,S.,Takagishi,K., Tsukamoto, Y., Morohoshi, Y., Nakano,T. and Kimura,M. 1991. Spontaneous Degenerative Polyarthritis in Male New Zeland Black/KN Mice. *Arthritis Rheum.* **34**: 171.

Nordling, C., Karlsson-Parra, A., Jansson, L., Holmdahl, R. and Klareskog, L. 1992. Characterization of a Spontaneously occurring Arthritis in Male DBA/1 Mice. *Arthritis Rheum.* **35**: 717.

Omata, T., Segawa, Y., Tamaki, H., Fujisaku, A. and Koike, T. 1997. Z-100, Extracted from *Mycobacterium tuberculosis* Strain Aoyama B, Inhibits the Development of Collagen-Induced Arthritis in Mice. *Biol. Pharm. Bull.* **20** (6): 694-697.

O'Sullivan, F.X., Fassbender, H., Gay, S. and Koopman, W.J. 1985. Etiopathogenesis of the Rheumatoid Arthritis-Like Disease in MRL/l Mice. I, The Histomorphologic Basis of Joint Destruction. *Arthritis Rheum.* **28**: 529-536.

O'Sullivan, F.X., Ray, C.J., Takeda, Y., Sharp, G.C., Walker, S.E. 1991. Long-Term anti-CD4 Treatment of MRL/lpr Mice Ameliorates Immunopathology and Lymphoproliferation but Fails to suppress Rheumatoid Factor Production. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **61**: 421-435.

Pataki, A. and Rordorf-Adam, C. 1985. Polyarthritits in MRL lpr/lpr mice. *Rheumatol. Int.* **5**: 113.

Pearson, C.M. 1956. Development of Arthritis, Periarthritis and Periostitis in Rats given adjuvant. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **91**: 95.

Piguet, P.F., Grau, G.E., Vesin, C., Loetscher, H., Hentz, R., Lesslauer, W. 1992. Evolution of Collagen Arthritis is Arrested by Treatment with anti-Tumor Necrosis Factor (TNF) Antibody or a Recombinant Soluble TNF Receptor. *J. Immunol.* **77**: 510-514.

Porcelli, S. 1993. Molecular Mimicry and the Generation of Autoimmune Diseases. *Rheumatol. Rev.* **2**: 41-50.

Pringozy, Th. I. , Sieling, P.A., Clemens, D. Et al. 1997. The Mannosa Receptor Delivers Lipoglycan Antigens to Endosomes for Presentation to T Cells by CD1b Molecule. *Immunity* **6**: 187-197.

Rahman, M.U., Hudson, A.P., Schumacher, H.R. Jr. 1992. Chlamydia and Reiter's Syndrome (Reactive Arthritis) . *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* **18**: 67-80.

Rammense, H-G, Kroschewsky, R., Frangoulis, B. 1989. Clonal Anergy Induced in Mature V β 6 T Lymphocytes on Immunizing Mls^{-b} Mice with Mls-1^a Expressing Cells. *Nature.* **339**: 541-544.

Ratkay, L.G., Tonzetich, J. and Waterfield, J.D. 1991. Antibodies to Extracellular Matrix Proteins in the Sera of MRL/lpr Mice. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **59**: 236.

Ratkay, L.G., Zhang, L., Tonzetich, J. and Waterfield, J.D. 1993. Complete Freund's Adjuvant Induces and Earlier and More Severe Arthritis in MRL-lpr Mice. *J.Immunol.* **151**: 5081-5087.

Rico, G., Ochoa, R; Oliva., González-Mendoza, A., Walker, S.M. and Ortiz-Ortiz, L. 1982. Enhanced Resistance to *Nocardia brasiliensis* Infection in Mice Depleted of Antigen-Specific B Cells. *J. Immunol.***129**: 1688-1693.

Schupbach, J. 1989. Clasification, Structure and Biology of Retroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **142**: 5-11.

Sercarrz, E., Lehmann, P.V., Ametani, A., Benichou, G., Miller, A., Moudgil, K. 1993. Dominance and Cripticity of T Cell Antigenic Determinants. *Annu. Rev. Immunol.* **11**: 729-766.

Shinmei, M., Masuda, K., Kikuchi, T. and Shimomura, Y. 1989. Interleukin 1, Tumor Necrosis Factor and Interleukin 6 as Mediator of Cartilage Destruction. *Semin. Arthritis Rheum.* **18:** 27-32.

Shinohara, S., Hirohata, S., Inoue, T. and Ito, K. 1992. Phenotypic Analysis of Peripheral Blood Monocytes Isolated From Patients With Arthritis Rheumatoid. *J. Rheumatol.* **19:** 211-215.

Silveira, L.H., Gutierrez, F., Scopelitis, E., Cuellar, M.L., Citera, G., Espinoza, L.R. 1992. Chlamydia -Induced Reactive Arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* **19:** 351-362.

Schumacher, Jr. R. Primer on the Rheumatic Diseases. 1993. Arthritis Foundation.

Sokoloff, L. And Hough, A.J. 1985 Pathology of Rheumatoid Disorders . *In* Arthritis and Allied Conditions. 10a. Edition. Mac Carty, D.J. ed. Arthritis and Allied Conditions. Lea & Febiger. p. 571-589.

Tanaka, A., O' Sullivan, F.X., Koopman, W.J. and Gay S. 1988. Etiopathogenesis of Rheumatoid Arthritis-Like Disease in MRL/l Mice: Ultrastructural Basis of joint destruction. *J. Rheumatol.* **15:** 10-16.

Tang, B., Matsuda, T., Akira, S., Nagata, N., Ikehara, S., Hirano, T., Kishimoto, T. 1991. Age-Associated Increase in Interleukin 6 in MRL/lpr Mice. *Int. Immunol.* **3:** 273-278.

Tar, L., Carafa, C., Levinson, A.I. 1985. *Staphylococcus aureus* Cowan I is a Potent Stimulus of IgM Rheumatoid Factor Production (abstract). *Arthritis Rheum. (Suppl).* **28:** S82.

Tarkowski, A., Jonsson, R., Holmdahl, R. and Klareskog, L. 1987. Immunohistochemical Characterization of Synovial Cells in Arthritic MRL-lpr/lpr Mice. *Arthritis Rheum.* **30**: 75-82.

Taugog, J.D., Richardson, J.A., Croft, J.T. Simmons, W.A., Zhou, M., Fernandez-Sueiro, J.L., Balish, E., Hammer, R.E. 1994. The Germ Free State Prevents Development of Gut and Joint Inflammatory Disease in HLA-B27 Transgenic Rats. *J. Exp. Med.* **180**: 2359-2364.

Taylor, G., Taylor-Robinson, D. and Keystone, E.C. 1978. Effects of Lymecycline on *Mycoplasma pulmonis*-Induced Arthritis in Mice. *Br. J. Exp. Pathol.* **59**: 204.

Theofilopoulos, A.N. and Dixon, F.J. 1981. Etiopathogenesis of Murine SLE. *Immunol. Rev.* **55**: 179.

Thompson, G. T. D., Alfa, M., Orr, K., Thompson, B. R. J. and Olson, N. 1994. Secretory Immune Response in Clinical Squelae of Salmonella Infection in a Point Source Cohort. *J. Rheumatol.* **21**:132-137.

Thorbecke, G.J.,Shah, R., Leu, C.H., Kuruvilla, A.P., Hardison, A.M. and Palladino, M.A. 1992. Involvement of Endogenous Tumor Necrosis Factor α andTransforming Growth Factor β During Induction of Collagen Type II Arthritis in Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 7375-7379.

Tumang, J.R., Posnett, D.N., Cole, B.C., Crow, M.K., Friedman, S.M. 1990. Helper T Cell- Dependent Human B Cell Differentiation Mediated by a Mycoplasmal Superantigen Bridge. *J. Exp. Med.* **171**: 2153-2158.

Van Den Berg, W.B., Joosten, L.A.B., Helsen, M.M.A., and Van de Loo, F.A.J. 1994. Amelioration of Established Murine Collagen Induced Arthritis with anti-IL-1 Treatment. *Clin. Exp. Immunol.* **95**: 237-243.

Wands, J.R., Mann, E., Alpert, E., Isselbacher, K.J. 1975. The Pathogenesis of Arthritis Associated with Acute Hepatitis-B Surface Antigen-Positive Hepatitis: Complement Activation and Characterization of Circulating Immune Complexes. *J. Clin. Invest.* **55**: 930-936.

Westacott, C.I., Whicher, J.T., Barnes, I.C., Thompson, D., Swan, A.J. and Dieppe, P.A. 1990. Synovial Fluid Concentration of Five Different Cytokines in Rheumatic Disease. *Ann. Rheum. Dis.* **49**: 676-681.

Wilder, R.L., Crofford-L.J. 1991. Do infectious Agents Cause Rheumatoid Arthritis?. *Clin. Orthop.* **265**: 36-41.

Williams, R.O., Feldmann, M. and Maini, R.N. 1992. Anti-Tumor Necrosis Factor Ameliorates Joint Disease in Murine Collagen-Induced Arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9784-9788.

Wooley, P.H., Dutcher, J., Widmer, M.B. and Gillis, S. 1993. Influence of a Recombinant Human Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor FC Fusion Protein on Type II Collagen- Induced Arthritis in Mice. *J. Immunol.* **151**: 6602-6607.

Wooley, P.H., Seibold, J.R., Whalen, J.D. and Chapdelaine, J.M. 1989. Pristane-Induced Arthritis: The Immunologic and Genetic Features of an Experimental Murine Model of Autoimmune Disease. *Arthritis Rheum.* **32**: 1022.

Zvaifler, N.J.1985 Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *In* Arthritis and Allied Conditions. McCarty, D.J. ed. Philadelphia, Lea and Febinger, 1985, p. 557-570.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF	Adyuvante completo de Freund
ADN	Acido desoxirribonucleico
AR	Artritis Reumatoide
BCD5+	Células BCD5+
BHI	Infusión cerebro-corazón
CF	Ciclofosfamida
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
FNT	Factor de necrosis tumoral
FR	Factor reumatoide
FSC-GM	Factor estimulador de colonias de Granulocitos y macrófagos
HLA-B27	Antígeno de histocompatibilidad B 27
H y E	Hematoxilina y Eosina
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IFN	Interferón
TCD4+	Linfocitos TCD4+
TCD8+	Linfocitos TCD8+
UFC	Unidades formadoras de colonias

APENDICE

REACTIVOS

FORMOL NEUTRO

Formaldehído 37%.....100 ml

Agua destilada900 ml

Fosfato de sodio monobásico.....4 g

Fosfato de sodio dibásico.....6.5g

Aforar a 1 L.

DESCALCIFICADOR ACIDO FORMICO-FORMOL

Acido fórmico.....150 ml

Formol.....50 ml

Agua destilada..... 800 ml

