

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS**



**PERFIL TRANSCRIPCIONAL EN FIBROBLASTOS SINOVIALES
MURINOS CON ARTRITIS INDUCIDA POR COLÁGENO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN FORMACIÓN BIOMÉDICA

PRESENTA:
ZAMIRA JUDITH VARGAS BURGOS

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. SUSANA AIDEÉ GONZÁLEZ CHÁVEZ

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO, FEBRERO 2023



**PERFIL TRANSCRIPCIONAL EN FIBROBLASTOS SINOVIALES MURINOSCON
ARTRITIS INDUCIDA POR COLÁGENO**

Tesis presentada para obtener el grado de:

MAESTRA EN FORMACIÓN BIOMÉDICA

Tesista:

Zamira Judith Vargas Burgos

Director de Tesis:

Susana Aideé González Chávez

Asesores:

Dr. César Pacheco Tena

Dr. José López Loya

Dra. Haydeé Parra Acosta

Chihuahua, Chihuahua., México, febrero 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Línea de investigación: Patogenia, diagnóstico y tratamiento de enfermedades inflamatorias e infecciosas

Sublínea de investigación: Enfermedades reumáticas

Equipo de investigación: Laboratorio de Investigación PABIOM

Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la UACH México

Web: <http://www.fm.uach.mx> Correo: pabiom@uach.mx Chihuahua, México, 2023

© Universidad Autónoma de Chihuahua

© Los autores. 2023

Todos los derechos reservados. Se permite la distribución, uso y copia citando la fuente completa.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., a 8 de febrero de 2023

DR. SAID ALEJANDRO DE LA CRUZ REY
SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que la C. **Zamira Judith Vargas Burgos** con número de matrícula 290069, ha concluido la elaboración de la tesis **"Perfil transcripcional en fibroblastos sinoviales murinos con artritis inducida por colágeno"** como requisito para obtener el grado de: Maestra en Formación Biomédica.

Así mismo, manifestamos que la tesis ha sido revisada y aprobada por los abajo firmantes, miembros del Comité de Grado.

Sin otro particular, quedamos de usted.

ATENTAMENTE

Dra. Susana Aideé González Chávez
Directora de Tesis

Dr. César Pacheco Tena
Asesor de Tesis

Dr. José López Loya
Asesor de Tesis

Dra. Haydée Parra Acosta
Asesora de Tesis



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**



Los que suscriben, **CERTIFICAN** que el presente trabajo titulado:

“Perfil transcricional en fibroblastos sinoviales murinos con artritis inducida por colágeno”

ha sido realizado por la **Ing. Zamira Judith Vargas Burgos** en el Laboratorio de Investigación PABIOM de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua para optar por el grado de:

MAESTRA EN FORMACIÓN BIOMÉDICA

Esta es una investigación original que ha sido realizada con rigor ético y científico, por lo que es autorizada su presentación ante el grupo de sinodales correspondiente.

Para los fines que haya lugar, se extiende la presente a los **ocho días del mes de febrero del dos mil veintitrés.**

Atentamente,

Dra. Susana Aidee González Chávez
Directora de Tesis
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Chihuahua

Dr. César Pacheco Tena
Asesor de Tesis
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Chihuahua

Dr. José López Loya
Asesor de Tesis
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Chihuahua

Dra. Haydee Parra Acosta
Asesora de Tesis
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Chihuahua

Dr. René Núñez Bautista
DIRECTOR
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Chihuahua

Dr. Said Alejandro de la Cruz Rey
SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Chihuahua



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**



El presente trabajo titulado “**Perfil transcripcional en fibroblastos sinoviales murinos con artritis inducida por colágeno**” realizado por la **Ing. Zamira Judith Vargas Burgos** fue revisado por los profesores integrantes del Comité Tutorial quienes constaron y avalaron los cambios, avances y logros de esta investigación desde su inicio.

Así mismo, y de conformidad con el Reglamento Interno de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas, el Reglamento General de Estudios de Posgrado y el Reglamento General Académico de la Universidad Autónoma de Chihuahua, ha sido **APROBADO** para su presentación y defensa para obtener el grado de:

MAESTRA EN FORMACIÓN BIOMÉDICA

COMITÉ TUTORIAL

Dra. Susana Ardeé González Chávez
Directora de Tesis
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Chihuahua

Dr. César Pacheco Tena
Asesor de Tesis
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Chihuahua

Dr. José López Loya
Asesor de Tesis
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Chihuahua

Dra. Haydee Parra Acosta
Asesora de Tesis
Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas
Universidad Autónoma de Chihuahua

Chihuahua, México a 8 de febrero de 2023

DEDICATORIA

Quiero expresar mi gratitud *a Dios*, quien con su bendición llena siempre mi vida y *a mis padres* por brindarme todo su amor, educación, valores, fortaleza, y apoyo incondicional.

A ustedes con amor infinito, toda la gratitud de mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a *Dios* quien siempre tiene los mejores planes para mí, con los cuales hace que pueda cumplir con mi propósito y misión de vida. Gracias vida por todas las experiencias que hoy son lecciones llenas de sabiduría, y por siempre ponerme en el camino correcto.

De manera especial a la *Dra. Susana A. González Chávez*, mi directora de tesis, con mucho respeto, afirmo es una de las personas quien más admiro, por su entrega, dedicación y profesionalismo. Gracias por todo el apoyo, comprensión, y sobre todo por abrirme las puertas de PABIOM.

Dr. Cesar Pacheco Tena, quien asesoro este proyecto de investigación, gracias por la dedicación, y por la pasión puesta en cada proyecto. Gracias por siempre tener la mejor disposición de compartir un poco de su conocimiento, y por el apoyo brindado.

Dra. Haydeé Parra Acosta, gracias por su profesionalismo para coordinar la maestría en formación biomédica y por el apoyo a lo largo de este trayecto.

Gracias a *Jasanai Sausamedia García, Alfredo Chávez Morales, Salma López Loeza, María Fernanda Alvarado, Eduardo Chaparro Barrera, Ana Victoria Molina Barraza, Melissa de la Rocha Palma, y Alejandra J. Rodríguez Castillo* por contribuir de alguna manera en la parte experimental de esta investigación.

A *Samara Acosta Jiménez, y Rubén Cuevas Martínez* por compartir conmigo su amor por la investigación.

A *cada uno* de los que forman parte de mi *familia PABIOM*, gracias por su amistad y cariño.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES.....	4
4.1 ARTRITIS REUMATOIDE	4
4.2 EPIDEMIOLOGIA.....	4
4.3 ETIOLOGÍA Y PATOGENIA	5
4.3.1 Factores del huésped.....	5
4.4 BIOLOGÍA DEL SINOVIO EN LA ARTRITIS REUMATOIDE	7
4.4.1 Microambiente del sinovio.....	8
4.4.2 Alteraciones en el microambiente del sinovio.....	8
4.5 CÉLULAS INMUNES EN LA ARTRITIS REUMATOIDE	9
4.5.1 Respuesta inmunitaria mediada por células T en la AR.....	9
4.5.2 Respuesta inmunitaria mediada por células B en la AR.....	10
4.5.3 Producción de anticuerpos	10
4.5.4 Presentación del antígeno	10
4.5.5 Secreción de citocinas	10
4.5.6 Activación de osteoclastos	11
4.5.7 Respuesta inmunitaria mediada por la inmunidad innata en la AR.....	11
4.5.8 Fibroblastos sinoviales en la Artritis reumatoide.....	11
4.6 MODELOS ANIMALES DE ARTRITIS REUMATOIDE.....	12
4.6.1 Modelos de artritis en el ratón DBA/1.....	14
5. DELIMITACIÓN DEL OBJETO DE ESTUDIO.....	18
5.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
5.2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
5.3 OBJETIVOS.....	18
5.3.1 Objetivo general	18
5.3.2 Objetivos específicos	18
6. JUSTIFICACIÓN.....	19
7. MATERIALES Y MÉTODOS	19
7.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	19
7.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO	20
7.2.1 Descripción de la población	20
7.2.2 Criterios de la selección	20
7.2.3 Tamaño de la muestra y muestreo	20

7.3	DEFINICIÓN DE VARIABLES	20
7.4	TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	20
7.4.1	<i>Animales</i>	20
7.4.2	<i>Inducción de la artritis</i>	20
7.4.3	<i>Aislamiento de la membrana sinovial</i>	22
7.4.4	<i>Extracción de ARN</i>	23
7.4.5	<i>Microarreglo de ADN</i>	23
7.4.6	<i>Análisis bioinformático</i>	24
7.5	CONSIDERACIONES ÉTICAS	24
8.	RESULTADOS	25
8.1	EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN MEMBRANA SINOVIAL DE RATONES DBA/1 ARTRÍTICOS	25
8.2	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE TNF E IL-6	44
9.	DISCUSIÓN	45
9.1	PAPEL DE LA INHIBICIÓN DE IL-6 Y TNF EN LA AR.....	47
9.2	VENTAJAS Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	47
10.	CONCLUSIONES	47
11.	REFERENCIAS	48



1. RESUMEN

Antecedentes y objetivo: La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad del grupo de las conectivopatías autoinmune sistémica que se caracteriza particularmente por la inflamación de la membrana sinovial, así como de la destrucción de la articulación afectada. El desarrollo de la AR es un proceso de múltiples etapas condicionado por la presencia de factores de riesgo genéticos y ambientales a partir de los cuales se desarrolla la inmunización sistémica. Nuestra investigación estudio el perfil de expresión de RNA en la membrana sinovial de ratones DBA/1 con Artritis inducida por colágena (AIC). **Materiales y métodos:** El estudio tuvo un diseño experimental en modelo animal e incluyó dos grupos de ratones. El segundo grupo experimental se conformó por cuatro ratones de la cepa DBA/1 con AIC, mientras que el grupo control se conformó por cuatro ratones de la cepa BALB/c. Las membranas sinoviales se de ambos grupos para realizar la extracción de ARN para su análisis transcriptómico. Se realizó RT-qPCR y microarreglos de ADN. Para la interpretación de la información sobre la expresión génica obtenida por el microarreglo se utilizaron tres plataformas bioinformáticas (David Bioinformatics Resources, String, y Cytoscape). Se identificaron los procesos biológicos y vías de señalización KEGG relacionadas con la AR. **Resultados:** Se identifico una expresión diferencial de 2,013 genes (puntaje $Z > 1.5$ DE), 1,229 genes sobre-regulados y 784 infra-regulados. Los genes diferencialmente sobre-expresados en la membrana sinovial con AIC, se asociaron significativamente ($p < 0.05$) con 53 procesos biológicos y 22 vías de señalización KEGG, mientras que los infra-expresados se asociaron en 63 procesos biológicos y 10 vías KEGG. Las proteínas Gbr2, Kras, Mapk10, Cdc42, y Prkacb fueron las más representativas de las interacciones proteína-proteína de los genes sobre-regulados, y se relacionaron principalmente con las vías KEGG: metabolismo del glutatión, vía de señalización de quimiocinas, citotoxicidad mediada por natural killer, MAPK, regulación de mediadores inflamatorios de los canales TRP, y Fagocitosis mediada por Fc gamma R. Las proteínas con mayor interacción infra-reguladas fueron PrKag2, Irs2, Sic2a4, y Cpt1c relacionadas principalmente con las vías KEGG: Metabolismo del ácido linoleico, vía de señalización de adipocitoquinas, vía de señalización NF-Kappa B, y vía de señalización de AMPK

Conclusiones : Este estudio demuestra la importancia del conocimiento del perfil de expresión diferencial de la membrana sinovial en ratones DBA/1 con AIC, y como los procesos biológicos y las vías de señalización asociadas participan en el desarrollo de la AR.



2. ABSTRACT

Background and objective: Rheumatoid arthritis (RA) is a disease of the group of systemic autoimmune connective tissue disorders that is particularly characterized by inflammation of the synovial membrane as well as destruction of the affected joint. The development of RA is a multi-stage process conditioned by the presence of genetic and environmental risk factors from which systemic immunization develops. Our research studied the RNA expression profile in the synovial membrane of DBA/1 mice with CIA. **Materials and methods:** The study is an experimental design in an animal model, two groups of mice were used. The control group consisted of four mice of the BALB/C strain. The second group was made up of four mice of the DBA/1 strain, in which collagen-induced rheumatoid arthritis was induced. Subsequently, the synovial membrane of both groups was extracted to perform RNA extraction to perform RT-PCR, then carried out the analysis of the transcriptional profile through microarrays and bioinformatics tools: DAVID bioinformatics, STRING, and Cytoscape. Biological processes and KEGG signaling pathways related to rheumatoid arthritis were identified. **Results:** A differential expression of 2,013 genes (Z score > 1.5 SD) was identified, of which 1,229 genes were upregulated and 784 downregulated, with respect to the control group of the BALB/C strain. Differentially overexpressed genes in the synovium of CIA arthritic mice were significantly ($p < 0.05$) associated with 53 biological processes and 22 KEGG signaling pathways. while those under-expressed were associated in 63 biological processes and 10 KEGG pathways. The Gbr2, Kras, Mapk10, Cdc42, and Prkacb proteins were the most representative of the protein-protein interactions of the upregulated genes and were mainly related to the KEGG pathways: glutathione metabolism, chemokine signaling pathway, mediated cytotoxicity. by natural killer, MAPK signaling pathway, regulation of inflammatory mediators of TRP channels, and Phagocytosis mediated by Fc gamma R. The proteins with the greatest downregulated interaction were PrKag2, Irs2, Sic2a4, and Cpt1c related mainly to KEGG: Metabolism of linoleic acid, adipocytokine signaling pathway, NF-Kappa B signaling pathway, and AMPK signaling pathway. **Conclusions:** This study demonstrates the importance of knowing the differential expression profile of the synovial membrane in DBA/1 mice with collagen-induced arthritis (AIC), and how the biological processes and associated signaling pathways participate in the development of RA.



3. INTRODUCCIÓN

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica de las articulaciones, caracterizada por inflamación de la membrana sinovial y sistémica. Puede causar daño a estructuras secundarias (cartílago y hueso), y discapacidad (1). Incluye afecciones extraarticulares como nódulos reumatoides que se desarrollan debajo de la piel, cerca de las articulaciones afectadas, afección pulmonar o vasculitis, y morbilidad asociada de tipo sistémico. (2) La AR afecta alrededor del 1% de las personas del mundo, y su presencia tiende a ser mayor en mujeres. Comúnmente entre los 30 a 50 años de edad es cuando se presenta. Son tres las categorías de los factores de riesgo que influyen en el desarrollo de la enfermedad: (Factores genéticos los cuales son de mayor peso para la AR, factores del huésped, y ambientales. Los factores ambientales tienen un papel determinante del riesgo final de enfermedad. Los factores ambientales se clasifican en cuatro categorías: agentes expuestos en el aire, microbiota, agentes infecciosos y factores socioeconómicos. El principal factor de riesgo de tipo ambiental es el tabaquismo. (3) Impacta significativamente la calidad de vida de quien la padece. Se asocia con discapacidad progresiva, complicaciones sistémicas, y muerte prematura aunado al gran impacto psicológico, económico y social.

En estudios recientes se ha demostrado que los sinoviocitos de tipo fibroblasto, que se encuentran en el revestimiento sinovial desarrollan fenotipos agresivos y producen mediadores patogénicos que conducen a la aparición y progresión de la enfermedad, desempeñando un papel importante en la fisiopatología de la AR. (4) Por tal razón, el presente estudio se centró en el análisis del perfil transcripcional de los fibroblastos sinoviales murinos con artritis inducida por colágeno mediante el uso de la tecnología de microarreglos. Estos hallazgos contribuyen al conocimiento actual identificando moléculas relevantes que puedan ser postuladas como blancos terapéuticos para la enfermedad.



4. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

4.1 Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica de tipo inflamatorio que afecta principalmente a las articulaciones sinoviales. Destaca por la relación que se genera entre las células y mediadores del mecanismo de la respuesta del sistema inmunitario innato y adaptativo. Esta interacción induce el desarrollo de inflamación de tipo local y sistémico en diferentes etapas de la enfermedad. Los principales signos son síntomas de inflamación articular y afección extraarticular. (4)

La AR se encuentra ampliamente asociada a discapacidad progresiva, complicaciones sistémicas y muerte prematura. Además de la hiperplasia sinovial e inflamación también se producen anticuerpos, como el factor reumatoide (FR) el anticuerpo contra la proteína citrulinada (ACPA), deformidades de cartílago y hueso, e incluso complicaciones a nivel sistémico hasta psicológico. Los loci en el genoma que guardan variantes para desarrollar la enfermedad son específicos del antígeno leucocitario humano de clase II HLA- complejo principal de histocompatibilidad (MHC) que codifican moléculas de MHC que pueden contener un epítipo compartido, muestran un grado de susceptibilidad fuerte a la artritis para desencadenar el trastorno de la AR. Es importante destacar que existen factores de riesgo de tipo ambiental como el tabaquismo, la enfermedad periodontal y la exposición a sílice que también pueden contribuir al desarrollo de la AR. (5)

4.2 Epidemiología

La mayoría de los estudios epidemiológicos sobre AR se han realizado en países occidentales y muestran una prevalencia de AR en el rango de 0,5 a 1,0% en los EE. UU. En general, las mujeres tienen de 2 a 3 veces más probabilidades de desarrollar AR que los hombres, se cree es causado por factores hormonales. El impacto genético en el desarrollo de la AR es fuerte, pero los factores ambientales también influyen.



4.3 Etiología y patogenia

La etiología de la enfermedad es desconocida. Mecanismos subyacentes a la patogénesis de la AR incluyen diversos componentes del sistema inmunológico. En personas con predisposición genética a desarrollar AR, una estrecha interacción entre las células y los mediadores del sistema inmunitario innato y adaptativo conduce a la amplificación y perpetuación de la inflamación y remodelación tisular, esto si se sobrepasa cierto umbral para que pueda generarse este proceso. (1) Los factores de riesgo asociados con el desarrollo de AR se pueden dividir en genéticos, epigenético, hormonal, reproductivos y neuroendocrinos; y factores del huésped comórbidos. Uno de los principales factores de riesgo ambientales es el fumar, la exposición de ciertos agentes en el aire, agentes de tipo infeccioso, microbiota bacteriana, la calidad de vida e inclusive factores sociales y económicos. (7)

4.3.1 Factores del huésped

De igual manera como sucede con otras enfermedades inflamatorias inmunomediadas (IMID), las cuales son de crónicas y altamente discapacitantes que comparten secuencias inflamatorias y desregulaciones inmunológicas, el huésped está estrechamente relacionado con el riesgo de desarrollar AR, principalmente por factores genéticos, que representan una proporción importante del riesgo de enfermedad. Se sabe de algunos mecanismos epigenéticos directamente involucrados en la patogénesis de la AR, de esta manera modulando el riesgo a desarrollar el padecimiento. Algunos ejemplos se ven influenciados por el entorno o factores de tipo ambiental. Sin embargo, se cree que los factores hormonales, reproductivos y neuroendocrinos también contribuyen al desarrollo de AR, dada el alto nivel en proporción hacia el sexo femenino que han generado la enfermedad. (7)

4.3.1.1 Factores genéticos

Un gran porcentaje de los pacientes con AR producen autoanticuerpos, se conoce bien el papel que juegan las células inmunitarias en el desarrollo del trastorno. También se sabe de la contribución de otros tipos de células en el tejido sinovial, como los fibroblastos. Existen importantes asociaciones genéticas con el locus de los HLA; sin embargo, diversas variantes genéticas no HLA representan un riesgo bajo de la enfermedad. Las asociaciones que existen



Entre los HLA como las variantes no HLA indican que los perfiles de las asociaciones genéticas para la AR con autoanticuerpos positivos frente a los autoanticuerpos negativos son diferentes. Varios alelos de HLA-DRB1 están asociados con un alto riesgo de AR con autoanticuerpos positivos, con el mayor riesgo caracterizado por la valina en la posición 11 de la secuencia de la proteína (alelos HLA-DRB1*04 y *10). Existe un fuerte efecto protector contra el riesgo de AR con autoanticuerpos positivos asociada con los alelos HLA-DRB1*13. Aunque se conocen las principales asociaciones genéticas, se desconoce el funcionamiento de los mecanismos específicos en el desarrollo de un mayor riesgo de AR. Un factor de riesgo de AR podría ser originado por interacciones gen-gen y gen-ambiente. Más de 150 loci con polimorfismos se asocian con la AR, principalmente relacionados con la enfermedad seropositiva. (8)

Dentro de la categoría de los factores de riesgo que afectan al huésped, se encuentran los de tipo epigenético. Los factores epigenéticos inducen variaciones hereditarias en la expresión génica sin cambios en la secuencia del ADN. Modificaciones de tipo epigenético pueden ser inducidas por estímulos externos (Factores de tipo ambiental: drogas, humo, dieta), podrían proporcionar el vínculo entre las interacciones del genoma y el medio ambiente. Los principales cambios epigenéticos incluyen la metilación del ADN, la variación en cambios de histonas de tipo postraduccional y el ácido ribonucleico no codificantes, todos los cuales han demostrado contribuir a la susceptibilidad para ser detonantes de la enfermedad. Debido a la preponderancia femenina en la distribución de la AR, se ha investigado y encontrado factores hormonales relacionados con el sexo que predisponen a la enfermedad. El desequilibrio hormonal se atribuye a los estrógenos, generalmente descritos como proinflamatorios, en oposición a los efectos antiinflamatorios de la progesterona y los andrógenos, que disminuyen en pacientes con AR de sexo masculino y femenino. Los estrógenos también poseen propiedades antiinflamatorias en varias células y tejidos, es probable que esto dependa de otros factores, tipo la concentración en suero y tejido, los tipos de células predominantes y receptores de estrógeno involucrados, así como la etapa edad. Otros factores intrínsecos a la etapa evolutiva y reproductiva de la mujer como la paridad, la lactancia materna, la pérdida del embarazo, la menarquia temprana, la edad del primer embarazo, los anticonceptivos orales y la terapia de reemplazo hormonal se han asociado al desarrollo del trastorno (8).



4.3.1.2 Factores del huésped comórbidos y de tipo ambiental

Existen asociaciones epidemiológicas de otras enfermedades concurrentes, aparentemente no relacionadas, con un mayor desarrollo de AR. No es igual a las comorbilidades que afectan a los pacientes con AR. Ejemplo de esto son enfermedad cardiovascular, infección, linfoma, y osteoporosis, que ocurren en tasas más altas que en la población general. También se cree que condiciones psiquiátricas tienen relación con la predisposición de desarrollar AR. Factores de tipo ambiental también juegan un rol que es importante destacar en el desarrollo de la enfermedad, Malos hábitos de salud como el consumo de drogas, tabaco y una mala alimentación, así como la falta de acceso a servicios de salud o factores socioeconómicos también son desencadenantes de la enfermedad. (8) La fisiopatología de la AR es muy compleja, hoy en día no existe tratamiento que pueda ser solución definitiva para la enfermedad. Los medicamentos que actualmente se utilizan pueden ralentizar síntomas característicos como el dolor e inflamación, ayudando a prevenir afecciones estructurales de los tejidos involucrados. Dentro de los medicamentos comunes, se encuentran los AINE, los GC, los FARME, los productos biológicos y algunos otros. La mezcla de factores como anticuerpos, cambios epigenéticos y modificaciones postraduccionales están involucrados en el desarrollo de la AR.

4.4 Biología del sinovio en la artritis reumatoide

La membrana sinovial, el tejido principal donde se produce la actividad de la AR, está compuesta por una matriz extracelular (MEC) única y células residentes. Las moléculas de ECM proporcionan señales que dictan el comportamiento celular específico del sitio programado. Una mejor comprensión del microambiente tisular, especialmente cómo la arquitectura sinovial, las moléculas de ECM y el comportamiento celular específico del sitio promueven la inflamación crónica y la destrucción tisular, podría ayudar a comprender el mecanismo de la patogenia. (6)

4.4.1 Microambiente del sinovio

Las células del estroma, las moléculas de la MEC y otras células residentes en los tejidos son componentes del microambiente del tejido sinovial. Las células del estroma forman parte de la arquitectura tisular y regulan su función. Las células estromales están compuestas por diferentes tipos de células como los fibroblastos, células endoteliales sanguíneas, linfáticas y



epiteliales. Los fibroblastos y macrófagos sinoviales son células estromales primarias en la membrana sinovial. La membrana sinovial es el tejido donde se origina la patología. Se encuentra conformada por una MEC laxa, altamente innervada y vascularizada y las células residentes del tejido residente, incluidos los macrófagos sinoviales, los fibroblastos sinoviales y otras células infiltrantes. (6)

4.4.2 Alteraciones en el microambiente del sinovio

Algunos factores característicos que cambian el microambiente del sinovio son la proliferación sinovial y diversos infiltrados celulares, dando origen a la inflamación crónica. Los macrófagos y los fibroblastos sinoviales en proliferación del tejido sinovial (pannus) liberan enzimas que degradan el hueso y el cartílago. La expresión génica en pannus es diferente de la membrana sinovial normal, aquí se encuentran factores como metaloproteinasas de matriz (MMP), receptores tipo Toll (TLR), y el factor de transcripción p53 están regulados al alza en el pannus. En la membrana sinovial de la articulación afectada, los fibroblastos de tipo sinovial proliferan y transforman el revestimiento sinovial en su proliferación. Los fibroblastos sinoviales proliferan ante la exposición a factores solubles de señalización, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el factor de crecimiento transformante- β , TNF o IL-1 β . Los fibroblastos sinoviales también sobre producen MMP, como MMP1, MMP3 y MMP13, y destruyen cartílago y estructuras ricas en colágeno de las articulaciones. Además, los fibroblastos sinoviales modulan las interacciones célula-célula y secretan citocinas, quimiocinas y factores proangiogénicos para facilitar la angiogénesis y la entrada, proliferación y supervivencia de las células inmunitarias. El reclutamiento de macrófagos, mastocitos, células T, células B y células dendríticas expande aún más la capa desub-revestimiento del sinovio. (6)

4.5 Células inmunes en la artritis reumatoide

El tejido sinovial en pacientes con AR se puede considerar como tejido linfoide terciario (TLT). El cual tiene conexión con el nivel de citocinas inflamatorias, esto siendo un indicador proporcional a la gravedad de la AR. La membrana crece en gran medida debido al aumento y la activación de sinoviocitos similares a macrófagos (MLS) que producen citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF), y sinoviocitos similares a fibroblastos (FLS), que son fuentes importantes de citocinas y proteasas. Abarcando moléculas de adhesión celular e inmunoglobulinas. Los FLS expresan IL6, algunas prostaglandinas y leucotrenos, también ayudando a la respuesta inmunitaria. También hay



células inmunitarias adaptativas, células B, plasmablastos y células plasmáticas. (2)

4.5.1 Respuesta inmunitaria mediada por células T en la AR

La AR es impulsada por linfocitos T CD4+, es decir, la IL-6 es un mediador importante de la destrucción ósea en la AR porque regula la producción de linfocitos T y la inflamación las citosinas se consideran fundamentales en la patogenia de la AR. Dos grupos celulares Th17 de tipo patógeno y no patógeno, dependiendo del medio de citoquinas presente durante el proceso de diferenciación. Las de tipo patógeno se consideran reguladores positivos de las respuestas inmunitarias dado a que producen citoquinas proinflamatorio, y las de tipo no patógeno pueden secretar factores inmunosupresores como IL-10 para modular negativamente la respuesta inmune.(2)

4.5.2 Respuesta inmunitaria mediada por células B en la AR

Las células B producen anticuerpos, presentación de antígenos, y la secreción de citoquinas. Relacionándose con el trastorno de inflamación crónica. (2)

4.5.3 Producción de anticuerpos

Los autoanticuerpos son secretados y producidos principalmente por células B autorreactivas impulsadas por TLR. La reactividad cruzada de las proteínas con modificación postraducciona (PTM) y de antígenos extraños pueden conducir a la expansión de las células B autorreactivas en la AR. La expresión excesiva de citidina desaminasa (AID) inducida por activación en células B de pacientes con AR se asocia con los altos niveles de citocinas de células T auxiliares IFN- γ e IL-17, lo que lleva al desarrollo de anti-CCP y RF. (2)

4.5.4 Presentación del antígeno

Son tres los tipos principales de células presentadoras de antígenos en el cuerpo humano: células dendríticas (DC), macrófagos y células B. La presentación de antígenos específicos a través del receptor de antígenos de células B se produce con una eficacia muy alta y da como resultado la activación de células T afines. Informes revelan que en la patología de la AR que en la sangre de los pacientes afectados por la enfermedad hay aumento en la frecuencia de células de tipo Tph y Tfh circulantes, las cuales son una subdivisión de las células T auxiliares CD4+. (2)



4.5.5 Secreción de citocinas

La membrana sinovial de los pacientes con AR contiene una estructura compleja de citoquinas que están relacionadas con el desarrollo de la AR. Las células B en la sangre periférica de los pacientes con AR pueden secretar muchas citocinas, incluidas CCL3, TNF- α , IFN-IFN- γ , IL-6, IL-1 β , IL-17 e IL-18 . TNF α puede aumentar la expresión de RANKL por parte de las células B en presencia de IL-1 β , promoviendo la formación de osteoclastos . (2)

4.5.6 Activación de osteoclastos

Las células B de memoria expresan el ligando NF- κ B (RANKL), una citocina clave que regula la homeostasis ósea. Los pacientes con AR ACPA positivos muestran una reabsorción ósea trabecular más pronunciada en el radio distal en comparación con los pacientes con AR seronegativos, independientemente de la duración de la enfermedad, la actividad y los tratamientos. (2)

4.5.7 Respuesta inmunitaria mediada por la inmunidad innata en la AR

Durante el inicio y desarrollo de la AR. El sistema inmunitario innato juega un papel importante. La respuesta inflamatoria que se observa en los pacientes con la AR es provocada por una serie de células inmunitarias innatas, incluidos los monocitos, macrófagos, y células dendríticas. Estas células interfieren y hacen que el sistema inmunitario adaptativo se active, lo cual es crucial en las últimas etapas de la enfermedad. (2)

4.5.8 Fibroblastos sinoviales en la Artritis reumatoide

La membrana sinovial sufre cambios durante el transcurso de la enfermedad, estos cambian la conformación por tejido invasivo hiperplásico, lo cual a su vez destruye la articulación.

Los FLS en el revestimiento sinovial desarrollan fenotipos agresivos y producen mediadores patogénicos que conducen a la aparición y progresión de la enfermedad, desempeñando un papel importante en la fisiopatología de la AR. (7).

En la AR, los FLS son el tipo de célula más común en la unión pannus-cartílago, lo que genera la destrucción articular a través de su producción de citosinas, quimiocinas y moléculas que degradan la matriz y al migrar e invadir las articulaciones de cartílago. Este tipo de células dañadas difieren de los fibroblastos sinoviales sanos, no solo en la expresión de su marcador, la



expresión del protooncogén o sus cambios epigenéticos, sino también en su metabolismo intracelular. Estos cambios de tipo metabólico son consecuencia del microambiente estresante de los tejidos inflamados, aquí los niveles concentraciones de nutrientes cruciales (glucosa, glutamina y oxígeno), no son iguales. Estos cambios metabólicos incrementan el intercambio de metabolitos entre los fibroblastos y otras células sinoviales, que potencialmente pueden activarse.

El metabolismo de la glucosa y los fosfolípidos, así como los lípidos bioactivos, incluidos la esfingosina-1-fosfato y el ácido lisofosfatídico, entre otros, están involucrados en la activación de FLS. Es probable que estos cambios metabólicos contribuyan a la participación de FLS en aspectos del inicio de la respuesta inmunitaria o respuestas inmunitarias anormales y contribuyan en gran medida a la destrucción de las articulaciones. (8)

En el desarrollo de la enfermedad, el fenotipo de las FLS cambia y genera un comportamiento invasivo similar al observado en condiciones tumorales. El microambiente modificado y estresante por FLS provoca el reclutamiento de otras células inmunes y causa, la formación de pannus. Los orígenes de este fenotipo canceroso se derivan fundamentalmente de los importantes cambios metabólicos en las vías del metabolismo de la glucosa, los lípidos y el oxígeno. Los cambios genéticos y epigenéticos tienen comportamientos similares al cáncer de los FLS con AR. (9) Además de producir la MEC y los lubricantes articulares, los FLS en la enfermedad generan mediadores patogénicos (citoquinas y proteasas) detonadores de la patogénesis de la AR. (10)

4.6 Modelos animales de artritis reumatoide

Los animales de laboratorio son herramientas valiosas para estudiar la fisiopatología de la enfermedad y para evaluar, validar reactivos y dispositivos terapéuticos. Los factores más importantes para la selección de los modelos animales son los siguientes: La predicción de los agentes evaluados en personas, la facilidad para utilizar el modelo, y que la patología de estudio tenga similitud con el ser humano. (11) Algunas de las diferencias que existen dentro de los patrones de progresión de la enfermedad en el modelo animal respecto al humano varían en cuestión de que es más rápido el tiempo en el modelo experimental, y que los roedores tienen una marcada resorción y formación ósea en respuesta a la inflamación de articulaciones.



Los modelos de roedores (por ejemplo, ratas y ratones) representan los objetos más utilizados. Existen diversos modelos animales, como la artritis en ratas por adyuvante (subplantar (ASP) e intraarticular (AIA)), o por corte del ligamento cruzado 6 anterior (CLX), en ratones son común es la artritis inducida por antígeno (AIA), artritis inducida por antígenos: albúmina de suero bovino (BSA) metilado, zymosan, modelos de artritis genéticamente manipulados o espontáneos, ejemplo el modelo de artritis inducida por colágeno tipo II (CIA) el cual es el más utilizado en la actualidad (12).

La artritis inducida por colágeno (AIC) autólogo o heterólogo es un modelo murino común utilizado para caracterizar la artritis autoinmune y para evaluar eficacia de la terapéutica para la AR. La susceptibilidad genética o la resistencia a la AIC en ratones está relacionada con ambos complejos de histocompatibilidad (MHC) y genes no-MHC (1, 8, 19). Ratones con los holotipos MHC clase II H-2q (DBA / 1, C3H, B10.Q) y H-2r (B10.RIII, RII / SJ), H-2w3 y H-2w17 son los más sensible a la inducción de AIC. Incluso dentro de cepas susceptibles de ratones, a menudo hay una marcada heterogeneidad de la enfermedad, incidencia y gravedad asociada con la fuente del proveedor, sexos, variabilidad Inter laboratorio, y protocolos de inmunización. (13) Esta clase de modelo se produce cuando se inmuniza las ratas contra colágeno tipo II. Desencadenando poliartrosis, en este proceso la respuesta inmune involucra linfocitos de tipo T y B, los cuales producen anticuerpos que atacan al colágeno tipo II. La AIA se ha utilizado más para la evaluación de agentes farmacéuticos, dado a ello existe más información para comparar con el ser humano. (11) En el caso de la artritis inducida por antígenos, no hay limitaciones en cuanto al uso de modelos animales, ya que se puede utilizar cualquier especie. En el caso del ratón ha sido el modelo mas usado para estudiar aspectos relacionados a citoquinas específicas en la patogénesis de la AR (11). El modelo de CLX en ratas supondría un tipo de artritis crónica producido por el desgaste articular, esta clase de modelo podría corresponder con un modelo de desgaste deportivo.

4.6.1 Modelos de artritis en el ratón DBA/1

La AIC es un modelo animal que demuestra tener varias similitudes patológicas e inmunológicas con el humano. En este modelo la inmunización se genera mediante un agente químico. Se



dice ser el modelo perfecto in vivo para estudios de RA. AIC actúa creando una respuesta inmune a la articulación en torno al antígeno: colágeno tipo II. Una de las características más importantes es que AIC genera anticuerpos contra el mismo organismo y el colágeno (antígeno). Este modelo es mediado por la activación de células T auxiliares en donde participan Th1 y Th17 induciendo AIC. Esta enfermedad ocurre en articulaciones, requiriendo la inmunidad de células T y células B, como anticuerpos a colágeno tipo II. (14)

Este colágeno es proveniente de varias fuentes animales, a su vez, este antígeno es introducido a los ratones en combinación con Adyuvante de Freund's completo o incompleto. La susceptibilidad a AIC está unida a la región I-A de los haplotipos H-2q y H-2r en ratones. (15)

Los ratones DBA/1 son esencialmente importantes por su región I-A del haplotipo H-2q, este ratón es un fuerte modelo de observación que desarrolla AIC dentro de un periodo de 21 días desde el inicio (16).

Por otro lado, el ratón DBA/1 ofrece el modelo de artritis espontánea, en donde los cambios en su medioambiente y el aumento consecuente del estrés de los ratones favorece el desarrollo espontáneo del proceso inflamatorio. Estos cambios constan del hacinamiento de varios ratones macho en una caja pequeña, poca cantidad de aserrín en las cajas que aumentan disfunciones biomecánicas y exposición a diferentes olores y sonidos (como feromonas de ratones de sexo femenino a lado de sus cajas). Estos cambios aumentan la formación de espondiloartritis (SpA), sobre todo, en ratones macho ancianos. La SpA es un grupo de enfermedades de inflamación crónica en articulación. La Espondilitis anquilosante (EA) es la más conocida, es caracterizada por inflamación y formación de nuevo hueso en el esqueleto axial y las articulaciones. Estos procesos contribuyen la pérdida de función y discapacidad, así como, la hinchazón de los dedos y la deformidad articular. Debido a que no existen ratones que mimeticen la enfermedad humana, como lo hacen los ratones DBA/1, es más común el uso de esta cepa de ratones. Los ratones DBA/1 ancianos desarrollan artritis espontánea en sus patas traseras por aumento de estrés. Esta cepa de ratones no tiene aberraciones inmunológicas u otros defectos patológicos. La enfermedad espontánea SpA en DBA/1 no requiere células T(17). La Tabla 1 muestra los antecedentes particulares del presente estudio.



Tabla 1. Antecedentes particulares

Autor y año	Objetivo	Estrategia metodológica	Hallazgos principales
Donate et al., 2010 (18)	<p>En este estudio se comparó la expresión de genes de autoantígenos de tejidos periféricos (PTA), que están involucrados en la autorrepresentación en el estroma tímico, de dos cepas de ratones; DBA-1/J (MHC-H2q) susceptible y DBA-2/J (MHC-H2d) resistente a la artritis inducida por colágeno (CIA). Posteriormente se evaluó si estas cepas diferían en su expresión de genes tímicos, lo que permitió la identificación de genes que podrían desempeñar un papel en la susceptibilidad/resistencia a la CIA. El perfil de micromatrices mostró que 1093 genes de PTA estaban modulados diferencialmente entre los ratones DBA-1/J y DBA-2/J inmunizados con colágeno. Los cuales fueron asignados a 17 tejidos/órganos diferentes, incluyendo articulaciones/huesos, caracterizando la expresión génica promiscua (PGE), que está implicada en la autorrepresentación. El agrupamiento jerárquico de datos de micromatrices y el análisis cuantitativo de RT-PCR mostró que Aire (regulador autoinmune), un regulador importante del proceso PGE, dependiente de Aire (insulina), independiente de Aire (Col2A1 y Gad67), y otros 22 autoantígenos articulares/óseos estaban regulados a la baja en DBA-1/J en comparación con DBA-2/J en el timo. Se reconstruyeron las redes transcripcionales de ambas cepas en función de los datos reales de microarrays. Estas demostraron que diferentes interacciones transcripcionales de MHC-H2 con genes de PTA. La cepa DBA-1/J presentó MHC-H2 como un nodo que influye en los genes aguas abajo. De manera diferente, en la red de cepas DBA-2/J, MHC-H2 se autorregula y no controla otros genes. Esto proporciona información de que la susceptibilidad a la CIA en ratones puede ser un reflejo de un control transcripcional similar a una cascada que conecta diferentes genes con MHC-H2 en el timo.</p>	<p>Estrategia metodológica de tipo experimental.</p> <p>Herramientas utilizadas: Microarreglos y RT-PCR.</p>	<p>Teniendo en cuenta la importancia de MHC-H2 en la autorrepresentación de péptidos y la susceptibilidad a la autoinmunidad, se reconstruyeron las redes transcripcionales de ambas cepas en función de los datos reales de microarrays. Las redes demostraron claramente diferentes interacciones transcripcionales de MHC-H2 con genes de PTA. La cepa DBA-1/J presentó MHC-H2 como un nodo que influye en los genes aguas abajo. De manera diferente, en la red de cepas DBA-2/J, MHC-H2 se autorregula exclusivamente y no controla otros genes. Estos hallazgos proporcionan evidencia de que la susceptibilidad a la CIA en ratones puede ser un reflejo de un control transcripcional similar a una cascada que conecta diferentes genes con MHC-H2 en el timo.</p>
Ge et al., 2021 (19)	<p>En este estudio el objetivo de la investigación fue identificar genes expresados diferencialmente (DEG), así como las vías y la infiltración inmune relacionada en la AR. Se utilizaron análisis bioinformáticos integrados y también se investigaron posibles mecanismos moleculares. Los perfiles de expresión de GSE55235, GSE55457, GSE55584 y GSE77298 se descargaron de la base de datos Gene Expression Omnibus, que dieron como resultados 76 muestras de membrana sinovial, incluidas 49 muestras de AR y 27 controles normales. Los conjuntos de datos de micromatrices se consolidaron y los DEG se adquirieron y analizaron más a fondo mediante técnicas bioinformáticas. Los análisis de enriquecimiento de la vía de la ontología génica (GO) y la Enciclopedia de genes y genomas de Kioto (KEGG) de los DEG los analizaron utilizando el software R (versión 3.6.1). La red de interacción proteína-proteína (PPI) de DEG se desarrolló utilizando la base de datos STRING. También dice que para finalizar se utilizó el CIBERSORT para evaluar la infiltración de células inmunes en la AR. Como resultados durante esta investigación, se reconocieron un total de 828 DEG, con 758 regulados al alza y 70 regulados a la baja. Los análisis de las vías GO y KEGG demostraron que estos DEG se centraron en la actividad del</p>	<p>Estrategia metodológica experimental y bioinformática.</p> <p>Herramientas utilizadas: Base de datos Gene Expression Omnibus. Software R (versión 3.6.1). String CIBERSORT</p>	<p>Este estudio muestra que la detección de DEG, las vías y la infiltración inmunitaria utilizando análisis bioinformáticos integrados podría ayudar a comprender los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la AR. También proporciona datos valiosos relacionados con los DEG, las vías y la infiltración inmunitaria de la AR y puede proporcionar nuevos conocimientos sobre la comprensión de los mecanismos moleculares.</p>



	<p>receptor de citoquinas y las vías de señalización relevantes. Los 30 genes más estrechamente relacionados entre los DEG se identificaron a partir de la red PPI. El análisis de componentes principales mostró que había una diferencia significativa entre los dos tejidos en la inmunidad a la infiltración. Los investigadores concluyeron que la detección de DEG, las vías y la infiltración inmune utilizando análisis bioinformáticos integrados podrían ayudar a comprender los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la AR. Además, nuestro estudio proporciona datos valiosos relacionados con los DEG, las vías y la infiltración inmunitaria de la AR y puede proporcionar nuevos conocimientos sobre la comprensión de los mecanismos moleculares.</p>		
<p>Zhou et al., 2021 (20)</p>	<p>Esta investigación fue realizada para explorar el mecanismo molecular inmune de la AR a través del análisis bioinformático. Utilizaron cinco conjuntos de datos de micromatrices y un conjunto de datos de secuenciación de alto rendimiento. Utilizaron el algoritmo CIBERSORT para evaluar la infiltración de células inmunes en los tejidos sinoviales entre la AR y el control sano (HC). Utilizaron la prueba de Wilcoxon y la regresión del operador de selección y contracción mínima absoluta (LASSO) para identificar los infiltrados significativamente diferentes de células inmunitarias. Los genes expresados diferencialmente (DEG) se examinaron mediante los métodos "Corrección por lotes" y "RobustRankAggreg". La correlación funcional de los DEG fue analizada por Gene Ontology (GO) y Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Los biomarcadores candidatos fueron identificados por cytoHubba de Cytoscape, y su eficacia diagnóstica fue predicha por el análisis de la curva característica del operador del receptor (ROC). La asociación de los biomarcadores identificados con células inmunitarias infiltrantes se analizaron mediante el análisis de correlación de rangos de Spearman en el software R. Los investigadores obtuvieron como resultados la identificación de diez tipos significativamente diferentes de células inmunitarias entre RA y HC. Obtuvieron un total de 202 DEG mediante la intersección de DEG seleccionados por dos métodos. La función de los DEG se asoció significativamente con las células inmunitarias. Cinco genes centrales (CXCR4, CCL5, CD8A, CD247 y GZMA) fueron examinados por el paquete R "UpSet". Verificaron que CCL5+CXCR4 y GZMA+CD8A tienen la capacidad de diagnosticar AR y AR temprana con la más excelente especificidad y sensibilidad, respectivamente. La correlación entre las células inmunitarias y los biomarcadores mostró que CCL5 se correlacionó positivamente con los macrófagos M1, CXCR4 se correlacionó positivamente con las células T CD4+ activadas por memoria y las células T auxiliares foliculares (Tfh), y GZMA se correlacionó positivamente con las células Tfh.</p>	<p>Estrategia metodológica de tipo experimental y bioinformático.</p> <p>Herramientas utilizadas: Algoritmo CIBERSORT</p> <p>Prueba de Wilcoxon y la regresión del operador de selección y contracción mínima absoluta (LASSO)</p> <p>STRING</p> <p>Cytoscape</p>	<p>CCL5, CXCR4, GZMA y CD8A se pueden utilizar como biomarcadores de diagnóstico para la AR. Las células GZMA-Tfh, los macrófagos CCL5-M1 y las células T CD4+ activadas por memoria CXCR4/células Tfh pueden participar en la aparición y el desarrollo de la AR, especialmente las células GZMA-Tfh para la patogenia temprana de la AR.</p>



5. DELIMITACIÓN DEL OBJETO DE ESTUDIO

5.1 Planteamiento del problema y pregunta de investigación

La AR es una enfermedad crónica, autoinmune y sistémica de tipo inflamatorio causada por diversos factores de tipo genéticos y ambientales. (21) Durante el desarrollo de la AR la membrana sinovial se transforma en tejido invasivo hiperplásico, lo que lleva a la destrucción de cartílago y hueso. (22) Fenotipos agresivos producidos por los sinoviocitos tipo fibroblasto localizados en el revestimiento de la membrana sinovial segregan mediadores patogénicos que impulsan la progresión de la AR (22) Razón por la cual fue objeto de estudio en esta investigación.

La AR es de etiología desconocida dado a ello, el proceso patogénico de la AR no se conoce completamente por lo que aún no hay una terapia completamente efectiva para tratar la enfermedad. Estudios recientes demuestran que los avances en experimentación animal y biología molecular ayudan significativamente al conocimiento del proceso patogénico de la AR. La evaluación de mediadores moleculares y los estudios de traducción ayudan a definir la relevancia de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad. (23).

5.2 Pregunta de investigación

¿Cuál es el perfil de expresión diferencial de la membrana sinovial en ratones DBA/1 con artritis inducida por colágeno (AIC)?

5.3 Objetivos

5.3.1 *Objetivo general*

Analizar el perfil de expresión de RNA en la membrana sinovial de ratones DBA/1 con AIC.

5.3.2 *Objetivos específicos*

- Obtener los perfiles transcripcionales de las membranas sinoviales de ratones DBA/1 con AIC a través de microarreglos de ADN.
- Identificar mediante análisis bioinformático los genes, vías de señalización y procesos biológicos asociados al metabolismo celular.



6. JUSTIFICACIÓN

Los modelos murinos de AR son una herramienta valiosa para la exploración de procesos patogénicos novedosos en la búsqueda de terapias más efectivas. El modelo de AIC en el ratón DBA/1 es ampliamente usado en la investigación actual, y es en el que nuestro grupo de investigación explora sus líneas de investigación. Si bien los perfiles transcripcionales de la articulación (sinovio, cartílago, hueso, entesis, ligamentos, etc.) inflamada en este modelo han sido caracterizados en el Laboratorio PABIOM, los perfiles específicos del sinovio, incluyendo los de los fibroblastos tipo sinoviocito, no han sido previamente reportados.

Obtener los perfiles transcripcionales masivos de la membrana sinovial en el modelo de AIC en el ratón DBA/1 permitirá puntualizar los eventos celulares del sinovio aislados del resto de los componentes articulares. Estos hallazgos contribuirán al conocimiento actual en la identificación de moléculas relevantes que puedan ser postuladas como blancos terapéuticos para la enfermedad. Asimismo, permitirán que los estudios posteriores en este modelo en el Laboratorio PABIOM puedan ser dirigidos hacia procesos propios de la membrana sinovial o de los fibroblastos tipo sinoviocitos.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Diseño del estudio

Es un diseño experimental en modelo animal, donde se tuvieron dos grupos de ratones. El grupo de control se conformó por cuatro ratones de la cepa BALB/C. El segundo grupo estuvo conformado por cuatro ratones de la cepa DBA/1, en el cual se intervino al inducir AR, para posteriormente extraer la membrana sinovial de ambos grupos para realizar extracción de ARN y después llevar a cabo el análisis del perfil transcripcional mediante la tecnología de microarreglos. Para poder responder a la pregunta de investigación se trabajó con modelos animales pues es ampliamente reconocido que en el estudio de AR es factible, ético y fácil de acceder a la población de estudio, por lo que este tipo de diseño es el más adecuado.



7.2 Población de estudio

7.2.1 Descripción de la población

Cuatro ratones macho DBA/1 de 8-10 semanas de vida. Cuatro ratones macho BALB/C de 8-10 semanas de vida.

7.2.2 Criterios de la selección

Criterios de inclusión: machos, de 8-10 semanas de edad, clínicamente sanos.

Criterios de exclusión: Ratones que en el curso de la observación desarrollen condiciones diferentes a la artritis.

7.2.3 Tamaño de la muestra y muestreo

Se incluyeron cuatro ratones de la cepa DBA/1 y cuatro ratones de la cepa BALB/c. Los ratones DBA/1 con AIC conformaron el grupo experimental, mientras que los ratones BALB/c el grupo control.

7.3 Definición de variables

Las variables se muestran en la Tabla 2, en la cual se incluye el tipo de variable, definición operacional, indicador de medición, escala de medición, y forma de medir la variable.

7.4 Técnicas y procedimientos

7.4.1 Animales

Los ratones estuvieron bajo un control de iluminación (12 de luz y 12 de oscuridad). La temperatura en la que se mantuvieron fue de $(23 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C})$. Recibieron alimento y agua ad libitum. Además de ser constantemente revisados.

7.4.2 Inducción de la artritis

La inducción se realizó según lo descrito por Brand et al. (24), bajo anestesia con isoflurano se aplicó una inyección intradérmica en la base de la cola con 50 μL de una emulsión con 0.1 mg de colágeno bovino tipo II con adyuvante completo de Freund. Se aplicó una segunda inyección el día 15 usando adyuvante incompleto de Freund y la misma cantidad de colágeno.



Tabla 2. Variables de estudio.

Variable	Definición operacional	Indicadores	Escala de medición	Forma de medir la variable
Variable independiente				
Artritis murina	Presencia de edema y deformidad en las articulaciones inducida por la administración de colágena.	Presencia de artritis clínica	Nominal: 0: sin artritis (sano) 1: con artritis	Escala visual
Variables dependientes				
Genes Expresados	Genes transcritos a moléculas de ARN	Cantidad de genes sobre y bajo expresados en hueso tarsal del ratón (Puntuación $Z \geq 1.5$ desviaciones estándar)	De razón De razón	Microarreglo de ADN
Vías de Señalización	Grupo de genes asociados en vías de señalización ya descritas.	Cantidad de vías sobre y bajo reguladas ($p < 0.05$)	De razón	Análisis bioinformático del microarreglo de ADN (DAVID Bioinformatic resource 6.8)
		Nombre de la vía de señalización asociada.	Nominal	Análisis bioinformático del microarreglo de ADN (DAVID bioinformatic resource 6.8)
Procesos Biológicos	Grupo de genes asociados en procesos biológicos ya descritos.	Cantidad de procesos sobre y bajo regulados ($p < 0.05$).	De razón	Análisis bioinformático del microarreglo de ADN (DAVID bioinformatic resource 6.8)
		Nombre del proceso asociado.	Nominal	
Expresión génica	Nivel de expresión de ARN de un gen con respecto a un gen de referencia.	Cuantificación relativa.	De razón	RT-PCR
Expresión De proteínas en tejido	Identificación de proteínas específicas en el cultivo celular.	Expresión de proteínas en fibroblastos con y sin artritis.	Ordinal: 0: <i>ausente</i> 1: <i>presente</i>	Inmunodetecciones



7.4.3 *Aislamiento de la membrana sinovial*

Para el procedimiento del aislamiento de la membrana sinovial se trabajó con dos grupos de ratones. El primer grupo de ratones estaba conformado por cuatro ratones de la cepa DBA/1 a los que previamente se les había inducido artritis por colágeno. El segundo grupo fue un grupo de control de también cuatro ratones de la cepa BALB/C, los cuales se trataban de ratones sanos. Los ocho ratones tenían entre 8-10 semanas de edad.

En primera instancia para el procedimiento se preparó instrumental de disección previamente esterilizado en una autoclave de plasma, después se enjuago con etanol al 70% durante algunos segundos, se repitió este paso, pero utilizando un potente antimicrobiano y desinfectante (DERMODEX Glutaraldehído) también por algunos segundos. Una vez lista y estéril el área de trabajo se realizó el sacrificio de los ratones mediante la práctica de eutanasia con isoflurano, este es un tipo de éter halogenado usado como anestésico inhalatorio, que en cierta concentración y tiempo provoca la muerte de los ratones sin sufrimiento alguno.

Una vez sin vida los ratones se enjugaron con etanol al 100%, este paso se realizó para asegurar la esterilidad durante la extracción de la membrana sinovial. Se prosigue a la eliminación de piel y tejidos blandos de las patas traseras de los ratones con tijeras y pinzas. Se localiza con cuidado la articulación de la rodilla y se produce un corte. Obtenida esta articulación se enjuago con etanol al 100% asegurando así su esterilidad. Cuando se obtuvieron todas las articulaciones mientras se continuo con el proceso del aislamiento de la membrana sinovial, se colocaron en una solución compuesta por el buffer de solución salina de Hank's y antibióticos (penicilina/estreptomicina) creando un ambiente propicio y similar al ambiente in vitro de la articulación, de esta manera se aseguró la estabilidad y vida de las células de la membrana sinovial. Posteriormente se trabajó con cada una de las articulaciones ubicando el ligamento de la rótula de la rodilla para localizar la membrana sinovial, logrando una extracción limpia con bisturí de la membrana sinovial. Cuando fueron obtenidas todas las membranas sinoviales se recolectaron en tubos tipo eppendorf para ser guardados y preservados en el ultracongelador a una temperatura de -80°C . Las membranas sinoviales fueron guardadas en el ultracongelador para poder ser utilizadas cuando sea necesario pues son idealmente preservadas. Después se prosigió a la extracción directa de RNA.



El procedimiento de extracción la membrana sinovial se siguió mediante un protocolo para cultivo, y extracción de membranas sinoviales. (25)

7.4.4 Extracción de ARN

La extracción del ARN total de las membranas sinoviales se realizó mediante el uso del Kit para extracción RNeasy ® Lipid Tissue Mini Kit de QIAGEN. Una vez extraídas las membranas sinoviales se pulverizaron por medio de nitrógeno líquido, lo que facilitó el proceso. Después para homogenizar las membranas se utilizó 1 ml de QIAzol Lysis Reagent de QIAGEN en un microtubo de 1.5 ml para luego ser incubado por 5 min a temperatura ambiente. Consiguientemente a ello, en el tubo se añadieron 200 µL de cloroformo después se agitó por 15 segundos y se incubó de nuevo a temperatura ambiente alrededor de 3 minutos. Terminado este tiempo, paso a centrifugación de 12,000 xg por 15 min a una temperatura de 4 grados °C, y se transfirió a fase acuosa en un tubo nuevo en el que se añadieron 600 µL de etanol al 70% y se mezclaron dando vortex. Siguiendo a esto, se transfirieron 700 µL a la columna de RNeasy Mini Spin, paso a centrifugación por 15 segundos a 8,000 xg a temperatura ambiente y se descartó el flujo del tubo de colección. Repitiendo este paso hasta que se transfirió todo el líquido por la columna. A la columna se le agregaron 700 µL de Buffer RW1, de nuevo se centrifugó también por 15 segundos a 8000 xg y se descartó el flujo del tubo de colección. Añadiendo 500 µL de Buffer RPE a la columna, se centrifugó por 2 minutos a 8,000xg, también quitando el fluido del tubo de colección. Se colocó la columna en un tubo nuevo y se centrifugó a velocidad máxima por 1 minuto. Posteriormente se colocó en un tubo de 1.5 ml, añadiendo 30 a 50 µL de agua libre de RNAsas y se centrifugó por 1 min a 8,000 xg. Por último, se agregó el volumen eluido en el paso anterior a la columna, repitiendo el proceso de centrifugación. El ARN obtenido se almacenó a - 20 °C, cuantificándose por fluorimetría utilizando el equipo Qubit4 de Thermo Scientific. Se colocó 1 µL del RNA en el equipo y se obtuvo la lectura de cantidad en ng/ µL por triplicado.

7.4.5 Microarreglo de ADN

Las muestras del ARN se enviaron al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM para el análisis de la expresión genética por microarreglos. La base de datos de los genes obtenidos en el microarreglo se encuentran disponibles en <https://microarrays.ifc.unam.mx/> La lectura y adquisición de las señales en el microarreglo se realizaron con el lector ScanArray 4000 (Packard



BioChips) y el análisis de los datos con el software GenArise (Instituto de Fisiología celular, UNAM).

7.4.6 Análisis bioinformático

Para el análisis bioinformático incluyo el uso de la plataforma DAVID Bioinformatics Resources <https://david.ncifcrf.gov> y para el análisis de genes desregulados en los procesos biológicos y sus asociaciones y vías de señalización KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (26). Además, la base de datos STRING 11.0 (<https://string-db.org/>) se utilizó para obtener el análisis e integración de las interacciones proteína-proteína (IPP) directas e indirectas basadas en las asociaciones funcionales (27). Los GDE identificados en el microarreglo se cargaron y las interacciones se seleccionaron con una confianza mínima (puntuación de interacción > 0.4). La red IPP obtenida se analizó más a fondo para obtener agrupaciones primarias de subredes utilizando el software Cytoscape (versión 3.7.0) con el complemento de detección de complejos moleculares (MCODE) ((28),(29)). a su vez, las subredes aquí obtenidas se sometieron nuevamente a STRING para analizar las IPP y visualizar las proteínas con mayor interacción y sus vías de señalización.

7.5 Consideraciones éticas

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Patogenia y Biomedicina Molecular PABIOM de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas siguiendo lo establecido por la Norma Mexicana NOM-062-ZOO-1999, las guías internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio, y la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1- 2002. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas con el número de identificación: CI-045-20.



8. RESULTADOS

8.1 Expresión diferencial de genes y vías de señalización en membrana sinovial de ratones DBA/1 artríticos

En la membrana sinovial de ratones de la cepa DBA/1 artríticos se encontró una expresión diferencial de 2,013 genes (puntaje $Z > 1.5$ DE): 1,229 sobre-regulados y 784 infra-regulados, con respecto a ratones BALB/C sanos. Los diez genes con mayor magnitud de expresión diferencial son mostrados en las Tablas 3 y 4 para los genes sobre e infra expresados respectivamente.

Tabla 3. Genes con mayor magnitud de sobre-expresión diferencial en ratones DBA-1 con artritis

Symbol	Name	Z-score
Tfpi2	Tissue Factor Pathway Inhibitor 2	5.600
Nmi	N-Myc And STAT Interactor	5.429
Zmym6	Zinc Finger MYM-Type Containing 6	5.284
Nat13	N-acetyltransferase 13	5.033
Zmynd17	Zinc finger MYND domain-containing protein 17	4.882
Crebzf	CREB/ATF BZIP Transcription Factor	4.827
Ppp6c	Protein Phosphatase 6 Catalytic Subunit	4.724
Lce1g	Late cornified envelope 1G [(house mouse)]	4.655
Ryr2	Ryanodine receptor 2.	4.618
Sgk3	Serine/threonine-protein kinase	4.561

Tabla 4. Genes con mayor magnitud de infra-expresión diferencial en ratones DBA-1 con artritis

Symbol	Name	Z-score
Map3k7ip1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 1	-5.153
Fam98b	Family With Sequence Similarity 98 Member B)	-4.975
Pak1	Activated Kinase 1	-4.768
Trpm4	activated nonselective cation channel	-4.763
Slc39a7	Solute Carrier Family 39 Member 7	-4.691
Rps6ka6	Ribosomal Protein S6 Kinase A6	-4.667
Olfir62	Olfactory receptor 62	-4.432
Adam3	disintegrin and metalloprotease 3	-4.355
Ink76	Mus musculus	-4.335
Cryba1	Crystallin Beta A1	-4.179



De acuerdo con el análisis bioinformático en la plataforma DAVID, los genes diferencialmente sobre-expresados en la membrana sinovial de ratones artríticos con AIC, se asociaron significativamente con ($p < 0.05$) con 53 procesos biológicos y 22 vías de señalización KEGG (Tablas 5 y 6), mientras que los infra-expresados se asociaron en 63 procesos biológicos y 10 vías KEGG (Tablas 7 y 8).

Tabla 5. Vías KEGG sobre- reguladas

KEGG_PATHWAY UP	Count	P-Value
Pancreatic secretion	13	4.80E-03
GnRH signaling pathway	11	6.70E-03
Neurotrophin signaling pathway	13	7.70E-03
Wnt signaling pathway	16	9.50E-03
Insulin secretion	10	1.40E-02
Ras signaling pathway	19	1.80E-02
Proteoglycans in cancer	17	2.10E-02
MAPK signaling pathway	22	2.30E-02
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	9	2.40E-02
Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series	4	2.70E-02
Osteoclast differentiation	12	2.80E-02
Amphetamine addiction	8	3.40E-02
Phospholipase D signaling pathway	13	3.50E-02
Salivary secretion	9	3.60E-02
Tight junction	14	3.60E-02
Regulation of actin cytoskeleton	17	3.80E-02
Adherens junction	8	3.90E-02
Calcium signaling pathway	18	4.10E-02
Non-small cell lung cancer	8	4.10E-02
ECM-receptor interaction	9	4.30E-02
Chemical carcinogenesis - receptor activation	17	4.40E-02
Parkinson disease	19	4.90E-02

Tabla 6. Vías KEGG infra-expresadas

KEGG_PATHWAY DOWN	Count	P-Value
Spliceosome	11	1.60E-03
Protein processing in endoplasmic reticulum	12	3.30E-03
Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species	13	8.40E-03
Salmonella infection	14	9.20E-03
Parkinson disease	13	2.90E-02
Non-alcoholic fatty liver disease	9	3.80E-02
Pathways of neurodegeneration - multiple diseases	19	4.00E-02
FoxO signaling pathway	8	4.20E-02
NF-kappa B signaling pathway	7	4.40E-02
Platinum drug resistance	6	4.60E-02



Tabla 7. Procesos biológicos sobre-expresados

BIOLOGICAL PROCESS UP	Count	P-Value
female pregnancy	14	5.20E-04
protein import into nucleus	13	1.30E-03
positive regulation of protein kinase B signaling	14	1.90E-03
Hemostasis	8	2.00E-03
negative regulation of canonical Wnt signaling pathway	14	2.50E-03
negative regulation of neuron death	10	5.00E-03
positive regulation of vascular smooth muscle cell proliferation	7	5.80E-03
membrane depolarization	6	5.90E-03
negative regulation of chromatin binding	4	6.00E-03
Vasodilation	8	6.30E-03
insulin receptor signaling pathway	8	1.00E-02
DNA repair	26	1.00E-02
signal transduction	72	1.10E-02
cellular response to DNA damage stimulus	32	1.20E-02
MAPK cascade	11	1.20E-02
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	54	1.20E-02
glucose homeostasis	14	1.20E-02
intracellular signal transduction	29	1.20E-02
protein autoubiquitination	9	1.30E-02
blood coagulation	9	1.30E-02
membrane protein proteolysis	4	1.30E-02
Wnt signaling pathway	18	1.30E-02
activation of protein kinase activity	7	1.30E-02
nervous system development	28	1.50E-02
regulation of transcription, DNA-templated	65	1.60E-02
positive regulation of cell migration	19	1.80E-02
JNK cascade	7	1.80E-02
locomotor rhythm	5	1.80E-02
protein phosphorylation	38	1.90E-02
amino acid import across plasma membrane	4	2.00E-02
positive regulation of axonogenesis	6	2.00E-02
adrenal gland development	5	2.10E-02
negative regulation of Wnt signaling pathway	7	2.10E-02
positive regulation of smooth muscle cell proliferation	9	2.10E-02
positive regulation of pri-miRNA transcription from RNA polymerase II promoter	8	2.30E-02
neurological system process	7	2.40E-02
Phosphorylation	36	2.60E-02
microtubule-based movement	9	2.60E-02
negative regulation of lipoprotein lipase activity	3	2.90E-02
establishment of localization in cell	15	2.90E-02
calcium ion transport	12	3.30E-02



response to drug	21	3.30E-02
positive regulation of cell proliferation	36	3.30E-02
ion transport	34	3.40E-02
regulation of MAPK cascade	6	3.70E-02
regulation of postsynaptic membrane potential	4	3.70E-02
positive regulation of spindle assembly	3	3.70E-02
regulation of meiotic nuclear division	3	3.70E-02
motor learning	3	3.70E-02
chordate embryonic development	3	3.70E-02
cardiac ventricle development	3	3.70E-02
positive regulation of MAPK cascade	14	3.90E-02
receptor internalization	6	4.00E-02
regulation of membrane potential	10	4.00E-02
mitotic sister chromatid cohesion	4	4.20E-02
positive regulation of mast cell degranulation	4	4.20E-02
kidney development	13	4.50E-02
endosome to lysosome transport	6	4.60E-02
amyloid precursor protein metabolic process	3	4.70E-02
positive regulation of vascular endothelial cell proliferation	4	4.80E-02
glial cell proliferation	4	4.80E-02
endocytosis	14	4.90E-02
heart development	19	4.90E-02

Tabla 8. procesos biológicos infra-expresados

BIOLOGICAL PROCESS DOWN	Count	P-Value
RNA splicing	17	6.30E-04
negative regulation of mRNA splicing, via spliceosome	5	2.00E-03
regulation of translation	11	2.10E-03
bone mineralization	7	2.20E-03
mRNA splicing, via spliceosome	12	2.40E-03
protein transport	27	3.60E-03
mRNA processing	18	3.70E-03
intracellular protein transport	16	4.30E-03
vitamin D metabolic process	3	5.00E-03
regulation of mitochondrial membrane potential	5	6.50E-03
positive regulation of transcription elongation from RNA polymerase II promoter	6	7.10E-03
regulation of apoptotic process	13	7.60E-03
Rho protein signal transduction	6	1.10E-02
Golgi organization	8	1.20E-02
negative regulation of cAMP-dependent protein kinase activity	3	1.30E-02
cellular response to insulin stimulus	8	1.60E-02
intracellular signal transduction	19	1.60E-02
negative regulation of T-helper 17 cell differentiation	3	1.70E-02
RNA polymerase II transcriptional preinitiation complex assembly	5	2.20E-02
intracellular steroid hormone receptor signaling pathway	3	2.50E-02



regulation of steroid biosynthetic process	3	2.50E-02
transmission of nerve impulse	4	2.80E-02
prostate gland epithelium morphogenesis	3	3.00E-02
chromatin remodeling	9	3.20E-02
lymph node development	4	3.30E-02
Leydig cell differentiation	3	3.40E-02
regulation of voltage-gated calcium channel activity	3	3.40E-02
positive regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway		3.60E-02
response to interferon-gamma	4	3.60E-02
positive regulation of transcription initiation from RNA polymerase II promoter	5	3.90E-02
regulation of epithelial to mesenchymal transition	3	4.00E-02
response to antipsychotic drug	2	4.50E-02
positive regulation of lymphocyte migration	2	4.50E-02
post-embryonic development	7	4.50E-02
positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	8	5.10E-02
vesicle-mediated transport	12	5.20E-02
response to antibiotic	4	5.50E-02
positive regulation of apoptotic process	15	5.80E-02

En el programa STRING se obtuvieron las redes de interacción proteína-proteína de los genes diferencialmente expresados (GDE). El análisis posterior de estas redes en el programa Cytoscape se agruparon los genes sobre e infra expresados en clusters donde áreas fuertemente interconectadas. Para los genes sobre-expresados se seleccionaron tres clusters representados en las Figura 1, 2 y 3, respectivamente para determinar las vías KEGG a la que dichos genes se asociaron (Tablas 9 y 10). El cluster 1, formador por 61 nodos y 270 ejes, se asoció a diversas vías relacionadas a algunos tipos de cáncer, dentro de las cuales se encuentran resistencia al inhibidor tirosina quinasa del receptor del factor epidérmico (EGFR), carcinogénesis química, leucemia mieloide crónica, entre otras. El cluster 2 se encuentra formado por 90 nodos y 192 ejes.

Se asocio a vías relacionadas con asma, biosíntesis de esteroides y Cascadas del complemento y de la coagulación, entre otras. El cluster 3 está formado por 26 nodos y 42 ejes, sin asociación a vías KEGG. Por último, el cluster 4 se encuentra conformado por 177 nodos y 726 ejes, se asoció a diversas vías relacionadas a un amplio espectro de enfermedades y factores estimulantes del cáncer, entre otras. Ejemplo de algunas de ellas son asma, adicción a la nicotina, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, hepatitis B, etc.

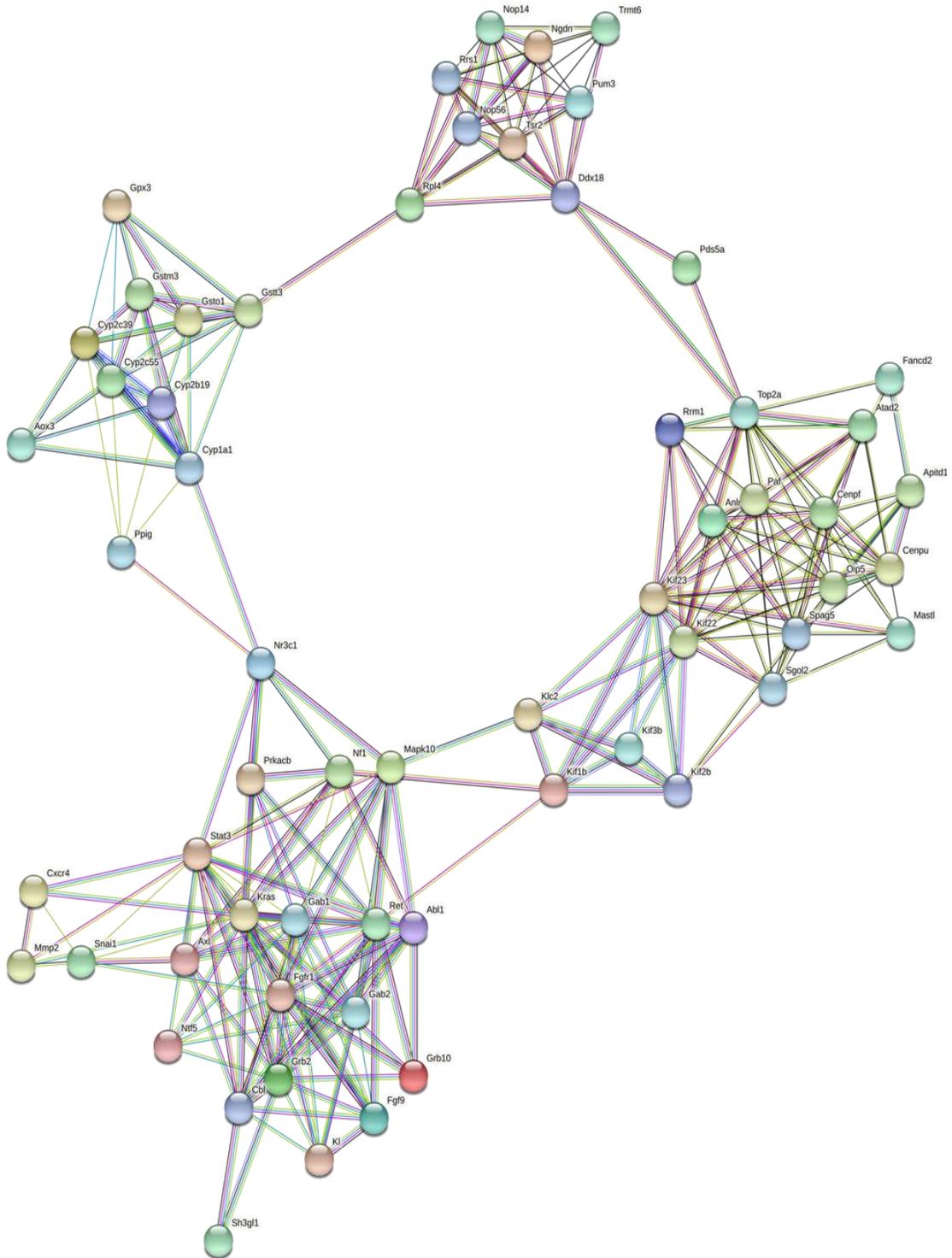


Figura 1. Red de interacciones proteína-proteína de los genes sobre-expresados en membrana sinovial de ratones DBA/1 con AIC agrupados en el Cluster 1



Tabla 9. Vías de señalización KEGG asociadas a los genes sobre-expresados en la membrana sinovial de ratones DBA/1 con AIC en el Cluster 1

Pathway	Description	Count	Strenght	FDR
mmu01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	6 of 78	1.44	8.24e-06
mmu04012	ErbB signaling pathway	6 of 81	1.43	8.24e-06
mmu05204	Chemical carcinogenesis	7 of 97	1.42	1.63e-06
mmu00480	Glutathione metabolism	5 of 69	1.42	6.94e-05
mmu05220	Chronic myeloid leukemia	5 of 74	1.39	8.65e-05
mmu04664	Fc epsilon RI signaling pathway	4 of 66	1.34	0.00077
mmu00982	Drug metabolism - cytochrome P450	4 of 68	1.33	0.00082
mmu04912	GnRH signaling pathway	5 of 86	1.32	0.00016
mmu00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	4 of 70	1.32	0.00086
mmu01522	Endocrine resistance	5 of 91	1.3	0.00019
mmu05216	Thyroid cancer	2 of 36	1.3	0.0275
mmu00830	Retinol metabolism	5 of 92	1.29	0.00019
mmu04917	Prolactin signaling pathway	4 of 74	1.29	0.00097
mmu04722	Neurotrophin signaling pathway	6 of 116	1.27	5.13e-05
mmu01524	Platinum drug resistance	4 of 77	1.27	0.0011
mmu05219	Bladder cancer	2 of 40	1.26	0.0322
mmu04014	Ras signaling pathway	11 of 224	1.25	6.73e-09
mmu00590	Arachidonic acid metabolism	4 of 86	1.23	0.0015
mmu00140	Steroid hormone biosynthesis	4 of 86	1.23	0.0015
mmu05223	Non-small cell lung cancer	3 of 66	1.22	0.0076
mmu05211	Renal cell carcinoma	3 of 66	1.22	0.0076
mmu04914	Progesterone-mediated oocyte maturation	4 of 90	1.21	0.0016
mmu00983	Drug metabolism - other enzymes	4 of 89	1.21	0.0016
mmu04935	Growth hormone synthesis, secretion and action	5 of 114	1.2	0.00043
mmu05230	Central carbon metabolism in cancer	3 of 69	1.2	0.0082
mmu05221	Acute myeloid leukemia	3 of 70	1.19	0.0084
mmu00591	Linoleic acid metabolism	2 of 47	1.19	0.0420
mmu05218	Melanoma	3 of 71	1.18	0.0085
mmu05212	Pancreatic cancer	3 of 74	1.17	0.0091
mmu03460	Fanconi anemia pathway	2 of 49	1.17	0.0440
mmu05205	Proteoglycans in cancer	8 of 199	1.16	8.24e-06
mmu04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	4 of 101	1.16	0.0023
mmu04926	Relaxin signaling pathway	5 of 127	1.15	0.00066
mmu00380	Tryptophan metabolism	2 of 51	1.15	0.0467
mmu04910	Insulin signaling pathway	5 of 133	1.13	0.00077
mmu05225	Hepatocellular carcinoma	6 of 168	1.11	0.00020
mmu05418	Fluid shear stress and atherosclerosis	5 of 141	1.11	0.00086
mmu04540	Gap junction	3 of 84	1.11	0.0127
mmu04750	Inflammatory mediator regulation of TRP channels	4 of 118	1.09	0.0039
mmu05210	Colorectal cancer	3 of 88	1.09	0.0141
mmu04211	Longevity regulating pathway	3 of 89	1.09	0.0143
mmu05206	MicroRNAs in cancer	5 of 158	1.06	0.0012
mmu04726	Serotonergic synapse	4 of 126	1.06	0.0048
mmu04915	Estrogen signaling pathway	4 of 130	1.05	0.0052
mmu04068	FoxO signaling pathway	4 of 130	1.05	0.0052
mmu05231	Choline metabolism in cancer	3 of 97	1.05	0.0174
mmu05215	Prostate cancer	3 of 99	1.04	0.0180
mmu04660	T cell receptor signaling pathway	3 of 102	1.03	0.0189



mmu04550	Signaling pathways regulating pluripotency of stemcells	4 of 137	1.02	0.0058
mmu05200	Pathways in cancer	15 of 528	1.01	4.88e-09
mmu04928	Parathyroid hormone synthesis, secretion and action	3 of 106	1.01	0.0199
mmu04010	MAPK signaling pathway	8 of 289	1.0	6.36e-05
mmu05224	Breast cancer	4 of 145	1.0	0.0069
mmu04062	Chemokine signaling pathway	5 of 184	0.99	0.0020
mmu05226	Gastric cancer	4 of 147	0.99	0.0070
mmu04072	Phospholipase D signaling pathway	4 of 147	0.99	0.0070
mmu05161	Hepatitis B	4 of 161	0.95	0.0085
mmu04380	Osteoclast differentiation	3 of 121	0.95	0.0275
mmu04071	Sphingolipid signaling pathway	3 of 122	0.95	0.0275
mmu04140	Autophagy - animal	3 of 137	0.9	0.0361
mmu05163	Human cytomegalovirus infection	5 of 236	0.88	0.0052
mmu05203	Viral carcinogenesis	4 of 194	0.87	0.0145
mmu05034	Alcoholism	3 of 147	0.87	0.0422
mmu04150	mTOR signaling pathway	3 of 156	0.84	0.0473
mmu05160	Hepatitis C	3 of 158	0.84	0.0482
mmu04810	Regulation of actin cytoskeleton	4 of 212	0.83	0.0187
mmu04714	Thermogenesis	4 of 225	0.81	0.0211
mmu04151	PI3K-Akt signaling pathway	5 of 355	0.71	0.0189
mmu01100	Metabolic pathways	11 of 1536	0.41	0.0189

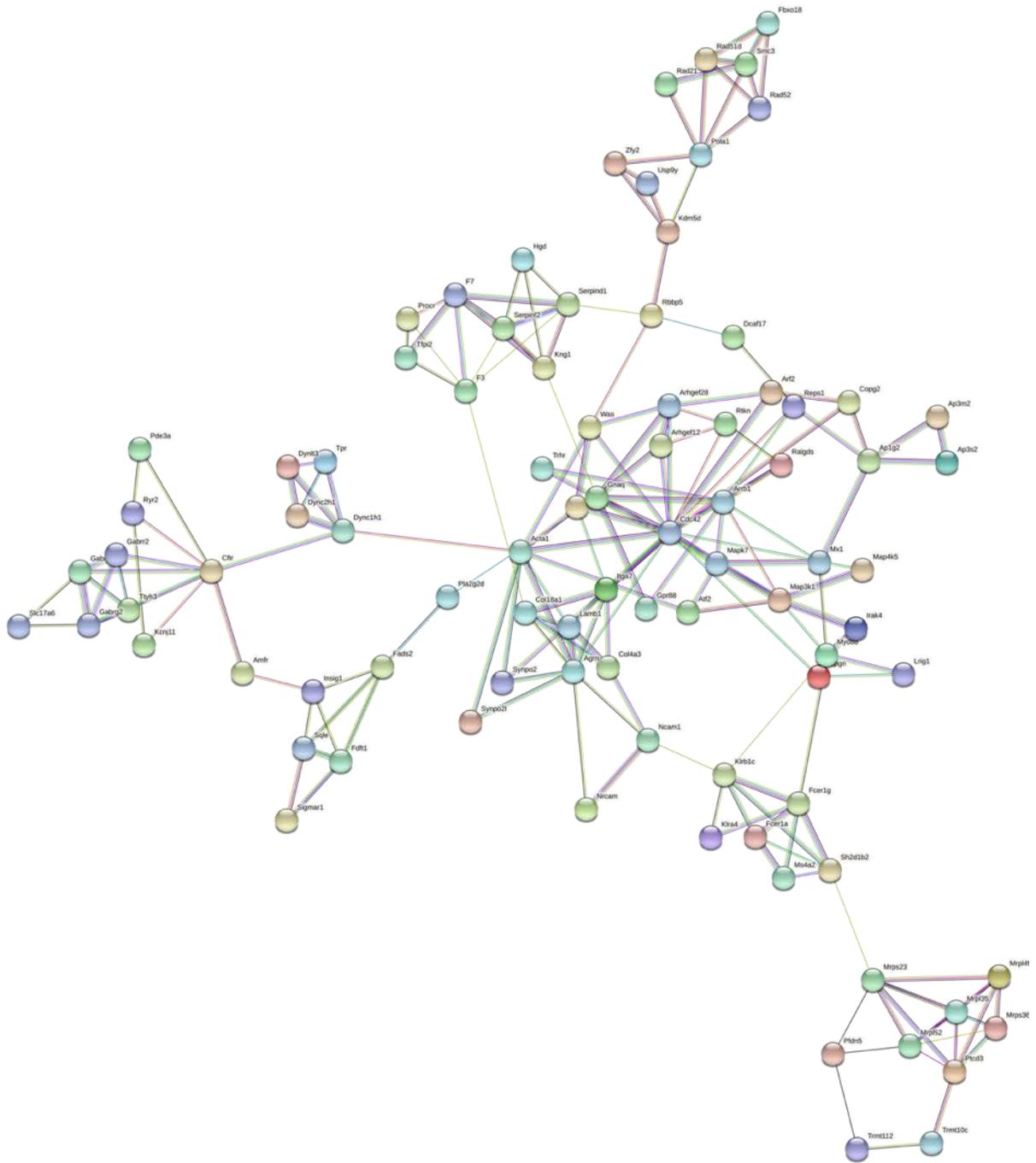


Figura 2. Red de interacciones proteína-proteína de los genes sobre-expresados en membrana sinovial de ratones DBA/1 con AIC agrupados en el Cluster 2



Tabla 10. Vías de señalización KEGG asociadas a los genes sobre-expresados en la membrana sinovial de ratones DBA/1 con AIC en Cluster 2

Pathway	Description	Count	Strenght	FDR
mmu05310	Asthma	3 of 24	1.49	0.0095
mmu05033	Nicotine addiction	4 of 39	1.4	0.0031
mmu00100	Steroid biosynthesis	2 of 20	1.39	0.0440
mmu05143	African trypanosomiasis	3 of 35	1.32	0.0133
mmu04610	Complement and coagulationcascades	6 of 92	1.2	0.00049
mmu05032	Morphine addiction	5 of 87	1.15	0.0031
mmu05135	Yersinia infection	7 of 124	1.14	0.00036
mmu05144	Malaria	3 of 53	1.14	0.0233
mmu04911	Insulin secretion	4 of 81	1.08	0.0130
mmu04929	GnRH secretion	3 of 62	1.07	0.0314
mmu04912	GnRH signaling pathway	4 of 86	1.06	0.0133
mmu04512	ECM-receptor interaction	4 of 87	1.05	0.0133
mmu04664	Fc epsilon RI signalingpathway	3 of 66	1.05	0.0358
mmu04071	Sphingolipid signalingpathway	5 of 122	1.0	0.0095
mmu05142	Chagas disease	4 of 100	0.99	0.0168
mmu04972	Pancreatic secretion	4 of 108	0.96	0.0209
mmu04650	Natural killer cell mediatedcytotoxicity	4 of 113	0.94	0.0233
mmu04723	Retrograde endocannabinoidsignaling	5 of 143	0.93	0.0128
mmu04722	Neurotrophin signalingpathway	4 of 116	0.93	0.0233
mmu04072	Phospholipase Dsignaling pathway	5 of 147	0.92	0.0130
mmu05132	Salmonella infection	7 of 213	0.91	0.0031
mmu04611	Platelet activation	4 of 120	0.91	0.0233
mmu04530	Tight junction	5 of 154	0.9	0.0133
mmu04022	cGMP-PKG signalingpathway	5 of 167	0.87	0.0143
mmu04510	Focal adhesion	5 of 196	0.8	0.0233
mmu04010	MAPK signaling pathway	7 of 289	0.77	0.0095
mmu05200	Pathways in cancer	8 of 528	0.57	0.0233

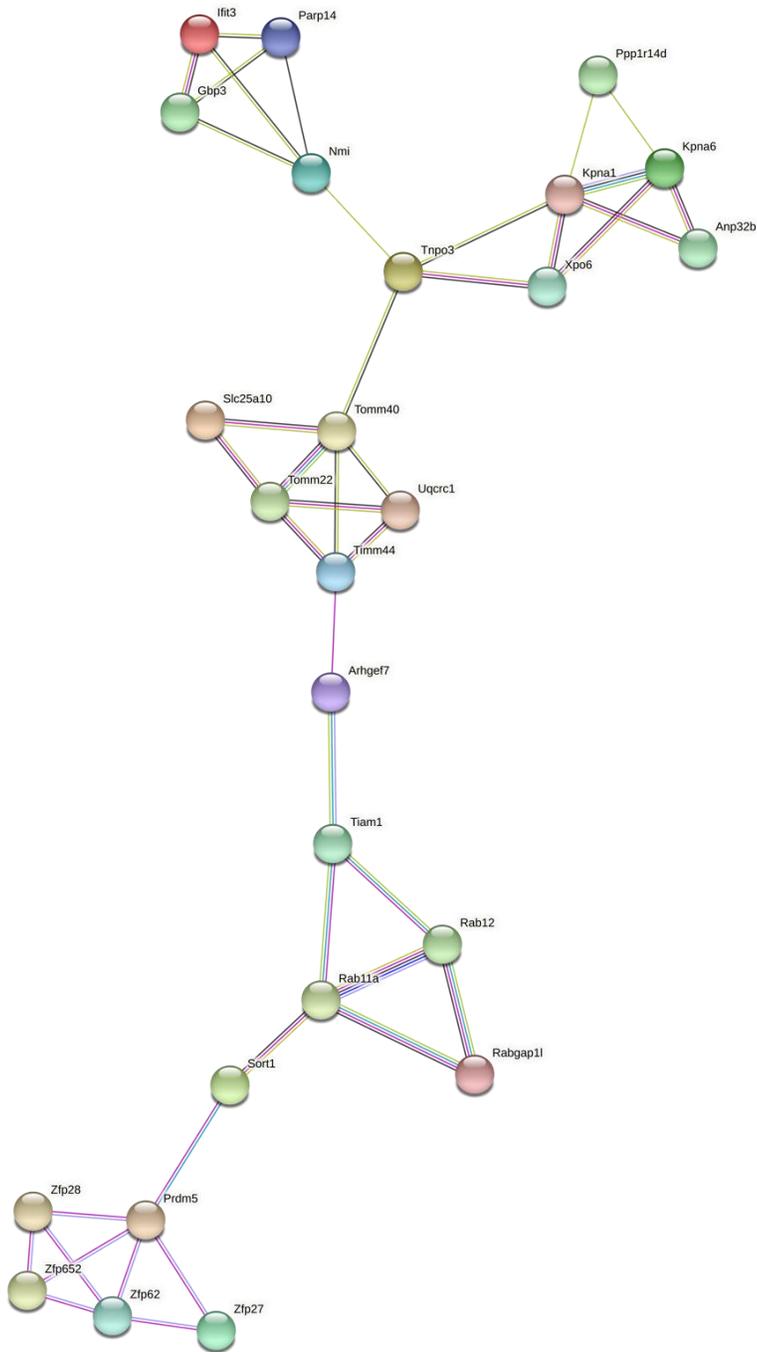


Figura 3. Red de interacciones proteína-proteína de los genes sobre-expresados en membrana sinovial de ratones DBA/1 con AIC agrupados en el Cluster 3



Tabla 11. Vías de señalización KEGG asociadas a los genes infra – expresados en la membrana sinovial de ratones DBA/1 con AIC en Cluster 1.

Pathway	Description	Count	Strenght	FDR
mmu03040	Spliceosome	9 of 131	1.35	1.50e-07
mmu03010	Ribosome	7 of 127	1.25	3.03e-05
mmu03015	mRNA surveillancepathway	4 of 96	1.13	0.0170
mmu04974	Protein digestionand absorption	4 of 108	1.08	0.0219
mmu00190	Oxidative phosphorylation	4 of 130	1.0	0.0338
mmu04932	Non-alcoholic fatty liver disease	4 of 148	0.94	0.0412
mmu05012	Parkinson disease	6 of 239	0.91	0.0119
mmu04714	Thermogenesis	5 of 225	0.86	0.0338
mmu05014	Amyotrophic lateralsclerosis	7 of 364	0.79	0.0119
mmu05020	Prion disease	5 of 264	0.79	0.0432
mmu05010	Alzheimer disease	6 of 359	0.73	0.0338

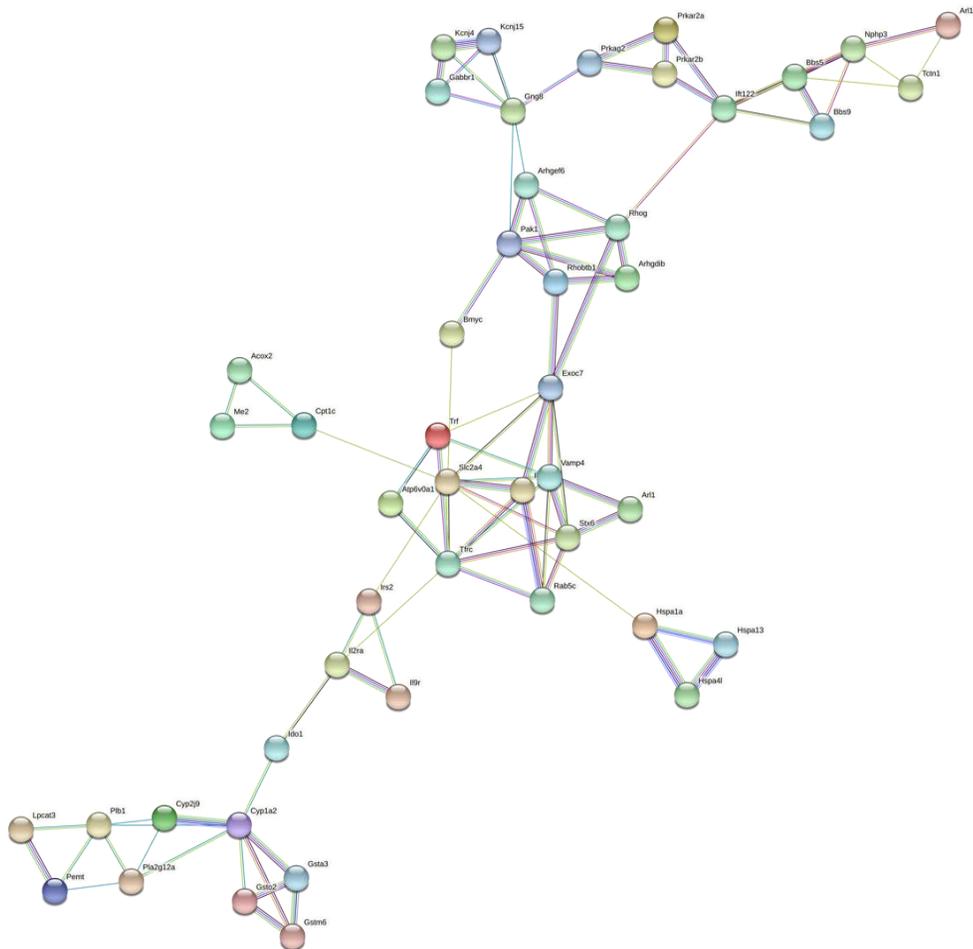


Figura 5. Red de interacciones proteína-proteína de los genes infra-expresados en membrana sinovial de ratonesDBA/1 con AIC agrupados en el Cluster 2

Tabla 12. Vías de señalización KEGG asociadas a los genes infra-expresados en la membrana sinovial de ratones DBA/1 con AIC en Cluster 2

Pathway	Description	Count	Strenght	FDR
mmu00592	alpha-Linolenic acid metabolism	2 of 23	1.6	0.0371
mmu00591	Linoleic acid metabolism	4 of 47	1.59	0.00075
mmu04216	Ferroptosis	3 of 40	1.54	0.0062
mmu04130	SNARE interactions in vesicular transport	2 of 32	1.46	0.0484
mmu04920	Adipocytokine signaling pathway	4 of 71	1.41	0.0018
mmu04213	Longevity regulating pathway – multiple species	3 of 61	1.35	0.0173
mmu04910	Insulin signaling pathway	6 of 133	1.32	0.00018
mmu00982	Drug metabolism - cytochrome P450	3 of 68	1.31	0.0206
mmu00564	Glycerophospholipid metabolism	4 of 95	1.29	0.0042
mmu00980	Metabolism of xenobiotics by cytochromeP450	3 of 70	1.29	0.0206
mmu04152	AMPK signaling pathway	5 of 123	1.27	0.00094
mmu00590	Arachidonic acid metabolism	3 of 86	1.2	0.0318
mmu04640	Hematopoietic cell lineage	3 of 91	1.18	0.0339
mmu05204	Chemical carcinogenesis	3 of 97	1.15	0.0371
mmu04931	Insulin resistance	3 of 109	1.1	0.0411
mmu04144	Endocytosis	4 of 249	0.87	0.0456
mmu01100	Metabolic pathways	10 of 1536	0.48	0.0371

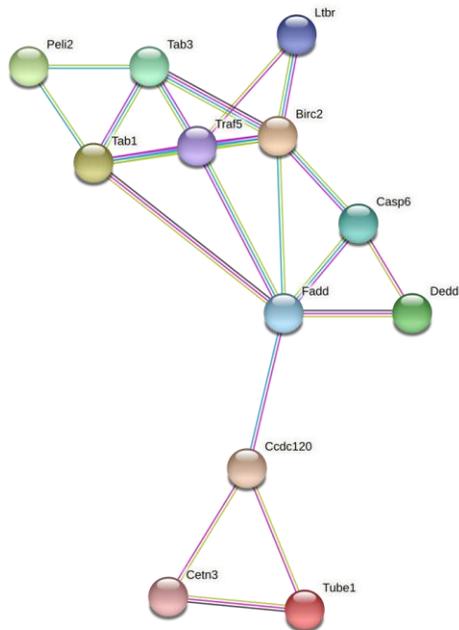


Figura 6. Red de interacciones proteína-proteína de los genes infra-expresados en membrana sinovial de ratonesDBA/1 con AIC agrupados en el Cluster 3



Tabla 13. Vías de señalización KEGG asociadas a los genes infra-expresados en la membrana sinovial de ratones DBA/1 con AIC en Cluster 3

Pathway	Description	Count	Strenght	FDR
mmu04215	Apoptosis – multiple species	2 of 32	2.06	0.0083
mmu04064	NF- Kappa B signaling pathway	4 of 99	1.87	7.16e-05
mmu04668	TNF signaling pathway	4 of 112	1.82	7.16e-05
mmu01524	Platinum drug resistance	2 of 77	1.68	0.0387
mmu04210	Apoptosis	3 of 135	1.61	0.0034
mmu04657	IL-17 signaling pathway	2 of 90	1.61	0.0459
mmu04621	NOD-like receptor signaling pathway	4 of 191	1.59	0.00031
mmu04620	Toll-like receptor signaling pathway	2 of 98	1.57	0.0476
mmu05132	Salmonella infection	4 of 213	1.54	0.00035
mmu05145	Taxoplasmosis	2 of 106	1.54	0.0476
Mmu05168	Herpes simplex virus 1 infection	3 of 413	1.13	0.0476

Con los genes de los clusters 1, 2 y 3 de los genes sobre-regulados y 1,2 y 3 de los infra-regulados se obtuvieron dos redes de interacción proteína-proteína (Figuras 7 y 8) para un análisis más detallado de las vías de señalización desreguladas en la membrana sinovial de ratones DBA/1 con AIC.

Los genes de los tres primeros grupos se cargaron en STRING para identificar las vías de señalización de KEGG asociadas. Los relevantes para la artritis fueron seleccionados y marcados con un código de color. En las Figuras 9 y 10 se presentan las proteínas con mayor interacción y sus vías de señalización.

Las proteínas Gbr2, Kras, Mapk10, Cdc42, y Prkacb fueron las más representativas de las interacciones proteína-proteína de los genes sobre-regulados, y se relacionaron principalmente con las vías KEGG: metabolismo del glutatión, vía de señalización de quimiocinas, citotoxicidad mediada por natural killer, vía de señalización MAPK, regulación de mediadores inflamatorios de los canales TRP, y Fagocitosis mediada por Fc gamma R.

En contraste, las proteínas con mayor interacción que se vieron infra-reguladas fueron PrKag2, Irs2, Sic2a4, y Cpt1c relacionadas principalmente con KEGG: Metabolismo del ácido linoleico, vía de señalización de adipocitoquinas, vía de señalización NF-Kappa B, y vía de señalización de AMPK.

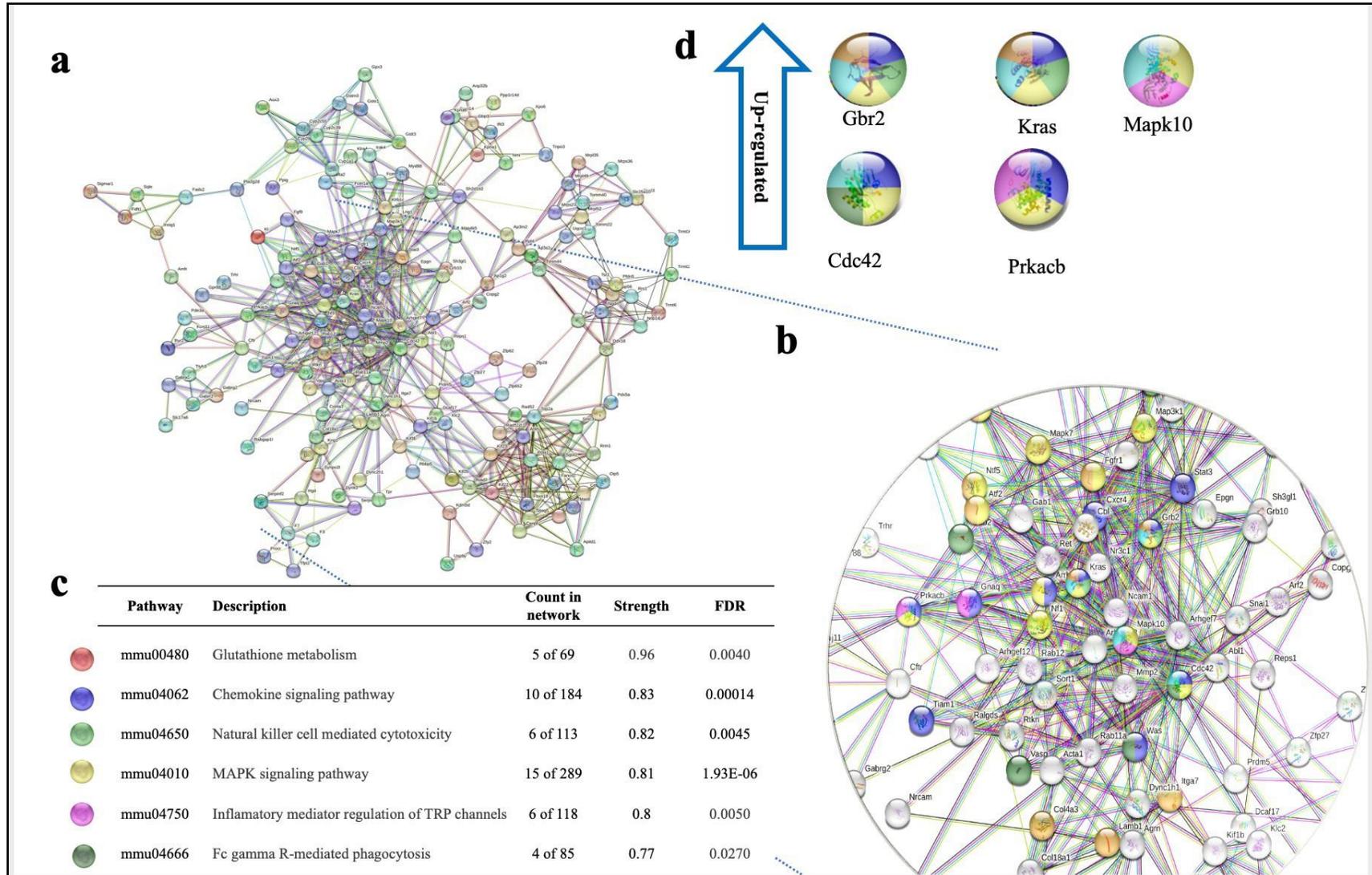


Figura 9. Vías KEGG asociadas con interacciones proteína-proteína de los genes sobre-regulados por la artritis.

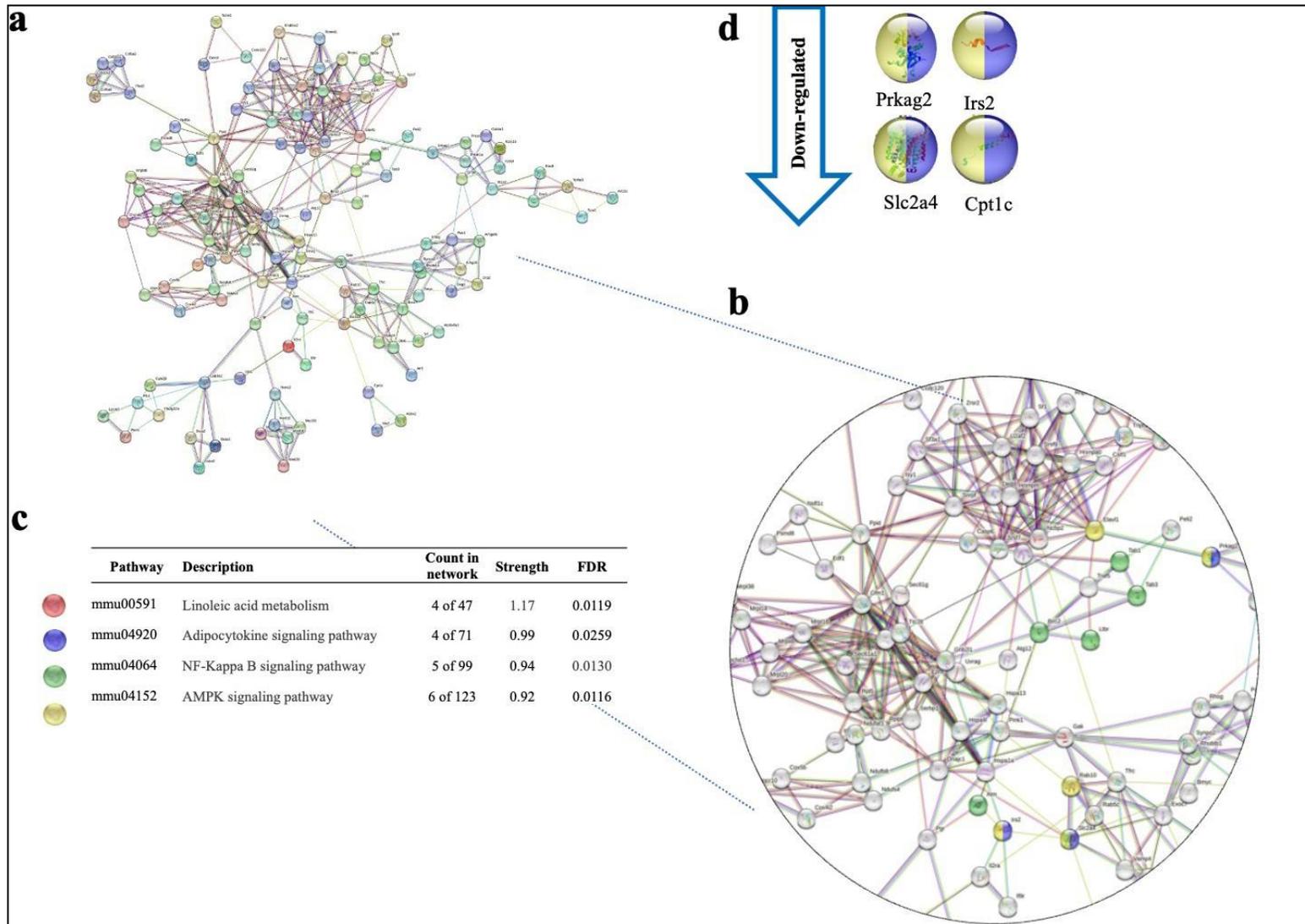


Figura 10. Vías de la Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto (KEGG) asociadas con interacciones proteína- proteína de los genes infra-regulados por la artritis. Las vías de señalización de relevancia en la artritis se seleccionaron y marcaron con diferentes colores. El grosor de la línea indica la fortaleza del soporte de datos.



8.2 Análisis de expresión génica de TNF e IL-6

A través del análisis de la expresión génica de TNF e IL6 mediante RT-PCR, se encontró que la expresión de IL6 fue significativamente mayor en el grupo experimental que en el grupo control.

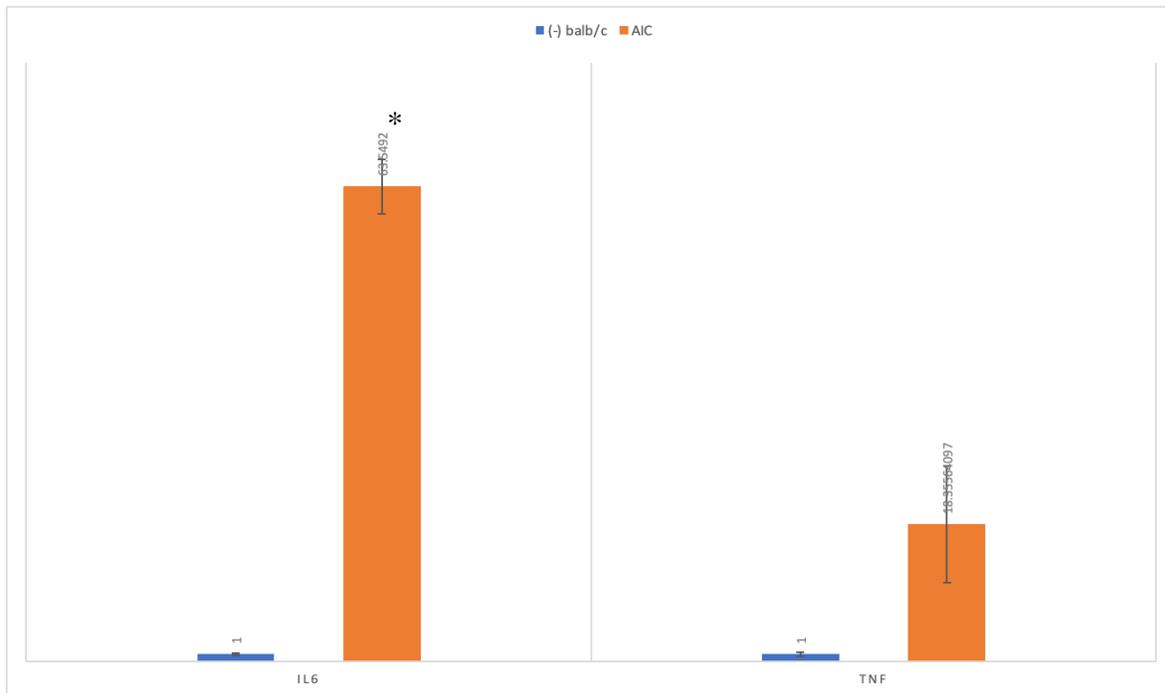


Figura 11. Análisis de la expresión génica de TNF e IL6 mediante PCR en membrana sinovial de ratones DBA/1 con AIC vs BALB/C sanos. * P= 0.0001.



9. DISCUSIÓN

Se desconoce la causa exacta del origen etiológico de la AR, diferentes investigaciones señalan la relación entre cambios inmunitarios como antecedente de la patogenia. En diferentes investigaciones destacan la importancia de las células de la membrana sinovial como factores desencadenantes en el proceso patogénico de la artritis. Razón por la cual nuestra investigación se centra en el estudio del perfil transcripcional de fibroblastos sinoviales murinos con artritis inducida por colágeno. Nuestra investigación demuestra los cambios en el perfil de expresión genético que existe durante el proceso patogénico de la AR. El uso del modelo murino ha sido establecido para este tipo de investigación ya que permite el abordaje de los procesos a nivel molecular y vías de señalización a través del análisis de microarreglos, el cual ofrece el estudio de un gran número de genes a la vez.

La literatura disponible sobre estudios existentes es delimitada y en mayor parte son estudios enfocados a muestras de sangre, articulaciones completas o en otras cepas de ratones o ratas. Al no contar con información similar relevante a la membrana sinovial, se compararon estudios para destacar diferencias entre los resultados de expresión diferencial de genes.

En nuestro estudio se expresaron diferencialmente 2,013 genes, 1,229 sobre-regulados y 784 infra-regulados, en un estudio realizado en el 2019 donde el perfil transcripcional intestinal revela una respuesta inmune inducida por habas en ratones DBA/1. El análisis de secuencias en profundidad identificó 769 genes expresados diferencialmente (DEG) asociados con el intestino en intestinos de ratones DBA/1 tratados con FB. Se demostró que los genes identificados están asociados con procesos biológicos (como la respuesta a estímulos y procesos del sistema inmunitario), vías de enfermedades humanas (como enfermedades infecciosas, enfermedades endocrinas y metabólicas y enfermedades inmunitarias) y vías del sistema orgánico (como el sistema digestivo, sistema endocrino, adaptación ambiental y sistema inmunológico). (30)

En una investigación reciente del 2022, donde el objetivo era conocer el papel de la azitromicina en la AR, los análisis transcripcionales sugirieron que el tratamiento con azitromicina altera las cascadas de señalización asociadas con la biosíntesis de colesterol y lípidos. GRP78 fue identificado como un nuevo objetivo de la azitromicina. (31)



Como un ejemplo más de investigaciones con las que se puede comparar la nuestra, es un estudio del 2010, donde la AIC en ratones presento una red transcripcional reguladora que conecto el complejo principal de histocompatibilidad (MHC H2) con genes de autoantígenos en el timo, El perfil de micro matriz mostró que 1093 genes de PTA estaban modulados diferencialmente entre ratones DBA-1/J y DBA-2/J inmunizados con colágeno. Estos genes fueron asignados a 17 tejidos/órganos diferentes, incluyendo articulaciones/huesos, caracterizando la expresión génica promiscua (PGE), que está implicada en la autorrepresentación. (32).

Las proteínas Gbr2, Kras, Mapk10, Cdc42, y Prkacb fueron las más representativas de las interacciones proteína-proteína de los genes sobre-regulados, y se relacionaron principalmente con las vías KEGG: metabolismo del glutatión, vía de señalización de quimiocinas, citotoxicidad mediada por natural killer, vía de señalización MAPK, regulación de mediadores inflamatorios de los canales TRP, y Fagocitosis mediada por Fc gamma R.

En el estudio realizado por Gwon et al., (33) solamente la vía MAPK se observó asociada con genes sobre-regulados, la vía MAPK está estrechamente relacionada con la proliferación celular y la apoptosis. En nuestro estudio esta vía también es sobresaliente y está ampliamente relacionada con la artritis entre otras.

En el estudio realizado por Yang (34), indico que las células NK desempeñan un papel inmunorregulador vital en el inicio y la cronicidad de las respuestas inflamatorias y autoinmunes, en especial en la AR. Las proteínas con mayor interacción que se vieron infra-reguladas fueron PrKag2, Irs2, Sic2a4, y Cpt1c relacionadas principalmente con KEGG: Metabolismo del ácido linoleico, vía de señalización de adipocitoquinas, vía de señalización NF-Kappa B, y vía de señalización de AMPK.

9.1 Papel de la inhibición de IL-6 y TNF en la AR

Las vías inflamatorias en donde interviene la glucoproteína IL-6 están relacionadas con el proceso patogénico de la AR. La inhibición de la IL-6, es considerada como una nueva opción terapéutica. Los fármacos anti-IL-6 se están utilizando con grados variables de éxito en otras enfermedades y se están probando en la AR. Los resultados han sido alentadores, particularmente cuando se ha



utilizado anti-IL-6 con otros fármacos, como el metotrexato (MTX). (35)

El factor de necrosis tumoral es una proteína que se caracteriza por causar inflamación. Por lo tanto, los inhibidores del TNF son medicamentos que ayudan a frenar la inflamación. Aunado a esto pueden impedir el avance de la enfermedad actuando directamente sobre TNF.

El exceso de TNF en la sangre de pacientes con afecciones reumáticas genera altos niveles de inflamación. El efecto del anti TNF ayuda en el control de la inflamación de manera general. (36)

9.2 Ventajas y limitaciones del estudio

El estudio proporciona el perfil transcriptómico de la membrana sinovial de ratones de la cepa DBA/1. No existe un control real para la cepa DBA/1, pues genéticamente es una cepa predispuesta enfermedades. No es una cepa de ratones con características sanas.



10. CONCLUSIONES

El presente estudio permitió la caracterización de la expresión genética diferencial en la membrana sinovial de ratones con AIC con respecto a ratones sanos. Las vías de señalización asociadas a los genes sobre expresados incluyeron algunas previamente descritas en la enfermedad humana como la vía de las MAPK. Por RT-PCR en tiempo real se confirmó que la expresión de las citocinas inflamatorias TNF e IL6 fue significativamente mayor en las membranas sinoviales de los ratones con AIC. Los resultados del presente estudio podrán compararse con los previamente descritos para la articulación completa (hueso, cartilago, ligamento, sinovio) en este modelo, para sugerir el involucro específico de la membrana sinovial en la enfermedad murina. Al ser un estudio pionero con un enfoque en el análisis del perfil de expresión diferencial de la membrana sinovial en ratones DBA/1 con AIC, es necesario realizar más investigación en este ámbito que permitan obtener más conocimiento sobre el desarrollo de artritis reumatoide.



11. REFERENCIAS

1. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*. septiembre de 2010;376(9746):1094-108.
2. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*. octubre de 2016;388(10055):2023-38.
3. Kolarz K, Targońska-Stepniak B, Majdan M. [Early reumatoid arthritis]. *Wiad Lek*. 2018;71(5):1061-5.
4. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews*. enero de 2010;233(1):233-55.
5. Petrelli F, Mariani FM, Alunno A, Puxeddu I. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: one year in review 2022. *Pathogenesis of rheumatoid arthritis: one year in review 2022*. 22 de marzo de 2022;40(3):475-82.
6. Jang S, Kwon EJ, Lee JJ. Rheumatoid Arthritis: Pathogenic Roles of Diverse Immune Cells. *IJMS*. 14 de enero de 2022;23(2):905
7. Romão VC, Fonseca JE. Etiology and Risk Factors for Rheumatoid Arthritis: A State-of-the-Art Review. *Front Med*. 26 de noviembre de 2021;8:689698.
8. Padyukov L. Genetics of rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol*. enero de 2022;44(1):47-62.
9. Mueller AL, Payandeh Z, Mohammadkhani N, Mubarak SMH, Zakeri A, Alagheband Bahrami A, et al. Recent Advances in Understanding the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: New Treatment Strategies. *Cells*. 4 de noviembre de 2021;10(11):3017.
10. Cheng CF, Liao HJ, Wu CS. Tissue microenvironment dictates inflammation and disease activity in rheumatoid arthritis. *Journal of the Formosan Medical Association*. junio de 2022;121(6):1027-33.
11. Wu Z, Ma D, Yang H, Gao J, Zhang G, Xu K, et al. Fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis: Surface markers and phenotypes. *International Immunopharmacology*. abril de 2021;93:107392.
12. Bustamante MF, Garcia-Carbonell R, Whisenant KD, Guma M. Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. diciembre de 2017;19(1):110.



13. Mousavi MJ, Karami J, Aslani S, Tahmasebi MN, Vaziri AS, Jamshidi A, et al. Transformation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis; from a friend to foe. *Autoimmun Highlights*. diciembre de 2021;12(1):3.
14. Nygaard G, Firestein GS. Restoring synovial homeostasis in rheumatoid arthritis by targeting fibroblast-like synoviocytes. *Nat Rev Rheumatol*. junio de 2020;16(6):316-33.
15. Kannan K, Ortmann RA, Kimpel D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology*. octubre de 2005;12(3):167-81.
16. De Simone E, Lastra Y, Caggiano N, Díaz J, Rubatino F, Ferretto A, et al. A comparative study of early stage arthritis in three experimental rat models. *Revista Colombiana de Reumatología (English Edition)*. abril de 2017;24(2):92-101.
17. Schuh JCL, Hall R, Lambert D, Harrington K, Mohler K, Barone D. Periosteal Hyperostosis (Exostosis) in DBA/1 Male Mice. *Toxicol Pathol*. abril de 2002;30(3):390-3.
18. Choudhary N, Bhatt LK, Prabhavalkar KS. Experimental animal models for rheumatoid arthritis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 4 de mayo de 2018;40(3):193-200.
19. McNamee K, Williams R, Seed M. Animal models of rheumatoid arthritis: How informative are they? *European Journal of Pharmacology*. julio de 2015;759:278-86.
20. Bessis N, Decker P, Assier E, Semerano L, Boissier MC. Arthritis models: usefulness and interpretation. *Semin Immunopathol*. junio de 2017;39(4):469-86.
21. Braem K, Carter S, Lories RJ. Spontaneous arthritis and ankylosis in male DBA/1 mice: further evidence for a role of behavioral factors in “stress-induced arthritis”. *Biol Proced Online*. diciembre de 2012;14(1):10.
22. Donate PB, Fornari TA, Junta CM, Magalhães DA, Macedo C, Cunha TM, et al. Collagen induced arthritis (CIA) in mice features regulatory transcriptional network connecting major histocompatibility complex (MHC H2) with autoantigen genes in the thymus. *Immunobiology*. mayo de 2011;216(5):591-603.
23. Ge Y, Zhou L, Chen Z, Mao Y, Li T, Tong P, et al. Identification of differentially expressed genes, signaling pathways and immune infiltration in rheumatoid arthritis by integrated bioinformatics analysis. *Hereditas*. diciembre de 2021;158(1):5.
24. Zhou S, Lu H, Xiong M. Identifying Immune Cell Infiltration and Effective Diagnostic Biomarkers in Rheumatoid Arthritis by Bioinformatics Analysis. *Front Immunol*. 13 de



agosto de 2021;12:726747

25. Jang S, Kwon EJ, Lee JJ. Rheumatoid Arthritis: Pathogenic Roles of Diverse Immune Cells. *IJMS*. 14 de enero de 2022;23(2):905.
26. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews*. enero de 2010;233(1):233-55.
27. Choudhary N, Bhatt LK, Prabhavalkar KS. Experimental animal models for rheumatoid arthritis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 4 de mayo de 2018;40(3):193-200.
28. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc*. mayo de 2007;2(5):1269-75
29. Armaka M, Gkretsi V, Kontoyiannis D, Kollias G. A standardized protocol for the isolation and culture of normal and arthritogenic murine synovial fibroblasts. *Protocol Exchange* [Internet]. 1 de mayo de 2009 [citado 25 de enero de 2023]; Disponible en: <http://www.nature.com/protocolexchange/protocols/558>
30. Du G, Xiao M, Zhu Q, Zhou C, Wang A, Cai W. Intestinal transcriptional profiling reveals fava bean-induced immune response in DBA/1 mice. *Biol Res*. diciembre de 2019;52(1):9.
31. Zhang Y, Ge L, Song G, Zhang R, Li S, Shi H, et al. Azithromycin alleviates the severity of rheumatoid arthritis by targeting the unfolded protein response component of glucose-regulated protein 78 (GRP78). *British J Pharmacology*. marzo de 2022;179(6):1201-19.
32. Donate PB, Fornari TA, Junta CM, Magalhães DA, Macedo C, Cunha TM, et al. Collagen induced arthritis (CIA) in mice features regulatory transcriptional network connecting major histocompatibility complex (MHC H2) with autoantigen genes in the thymus. *Immunobiology*. mayo de 2011;216(5):591-603.
33. Zhang Y, Ge L, Song G, Zhang R, Li S, Shi H, et al. Azithromycin alleviates the severity of rheumatoid arthritis by targeting the unfolded protein response component of glucose-regulated protein 78 (GRP78). *British J Pharmacology*. marzo de 2022;179(6):1201-19.
34. Yang Y, Day J, Souza-Fonseca Guimaraes F, Wicks IP, Louis C. Natural killer cells in inflammatory autoimmune diseases. *Clin Transl Immunol* [Internet]. enero de 2021 [citado 25 de enero de 2023];10(2). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cti2.1250>
35. Pandolfi F, Franza L, Carusi V, Altamura S, Andriollo G, Nucera E. Interleukin-6 in



Rheumatoid Arthritis. IJMS. 23 de julio de 2020;21(15):5238.

36. Radner H, Aletaha D. Anti-TNF in rheumatoid arthritis: an overview. Wien Med Wochenschr. enero de 2015;165(1-2):3-9.