

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA

FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS BIOMÉDICAS

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



**EFFECTO DEL AYUNO INTERMITENTE SOBRE LA INFLAMACIÓN
Y LA DESTRUCCIÓN ARTICULAR EN MODELO MURINO
DBA/1 CON ARTRITIS INDUCIDA POR COLÁGENO**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

RUBÉN CUEVAS MARTÍNEZ

CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO, OCTUBRE DE 2023



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



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

“Efecto del Ayuno intermitente sobre la inflamación y la destrucción articular en modelo murino DBA/1 con artritis inducida por colágeno”

ha sido realizado por el **Dr. Rubén Cuevas Martínez** 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:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

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 **diez días del mes de octubre del dos mil veintitrés.**

Atentamente

Dra. Susana Aideé 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. Rolando Martínez Romero
Asesor de Tesis
Centro de Investigación en
Materiales Avanzados, Chihuahua

Dra. Mercedes Bermúdez Cortés
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

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis papás Soco y Rubén quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades, si no tomarlas como impulso.

Además, a mis hermanos y abuelitos, por su apoyo y confort en los momentos difíciles.

“Menti da lucem, manibus artem”

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a esas personas que con su amplio conocimiento me guiaron para poder cumplir esta meta, que en algún momento se vio muy lejana, agradezco enormemente a esas personas que hoy me enorgullezco de decir maestros, la Dra. Susy, por su apoyo y su forma tan especial de persona que es, ganado tiene el cielo y obviamente, gracias Dr. Pacheco, agradezco su guía en todo momento y su sentido del humor tan único, no me alcanzarían las palabras para agradecer todo lo que han hecho por mí, por tener la paciencia de enseñarme, guiarme a lo largo de este largo posgrado y más sabiendo quien era jaja, eso se merece un agradecimiento doble.

Agradezco ampliamente a todos y cada uno de los integrantes de esta gran familia que es PABIOM, es el lugar que más me hace sentir orgulloso de decir que pertenezco.

Un especial agradecimiento para mis nuevos amigos Ernesto, Ana, Fanny, Andrés, David, Daniel, Mariana, Xiomara, Marisol, Karen, Salma, Mariel, Andrea y Rojas, los cuales siempre saben cómo hacer cada momento el mejor de mi vida, gracias por todo.

Un muy especial agradecimiento a las personas que han confiado en mi para pedirme un consejo y apoyo en estos rollos de la investigación

Por último, agradezco a todas las personas que de una u otra manera ayudaron o estuvieron a lo largo de todos estos años tan largos de carrera, maestría y cualquier otro posgrado que se me ocurra.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. MARCO TEÓRICO	4
3.1 ARTROPATÍAS INFAMATORIAS.....	4
3.1.1 <i>Artritis reumatoide</i>	6
3.2 MODELOS MURINOS DE ARTROPATÍAS INFLAMATORIAS	8
3.3 AYUNO INTERMITENTE (AI)	9
3.3.1 <i>Efectos fisiológicos del ayuno intermitente</i>	10
3.3.2 <i>Efectos antiinflamatorios del ayuno intermitente</i>	11
3.4 AYUNO INTERMITENTE EN ARTROPATÍAS INFLAMATORIAS	12
3.5 MODELOS MURINOS DE AYUNO INTERMITENTE.	13
4. ANTECEDENTES	14
TABLA 1. ANTECEDENTES PARTICULARES	15
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
6. JUSTIFICACIÓN.....	17
7. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
8. HIPÓTESIS	18
9. OBJETIVOS.....	18

9.1	OBJETIVO GENERAL.....	18
9.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
10.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
10.1	DISEÑO.....	19
10.2	SUJETOS DE ESTUDIO	19
10.3	TAMAÑO DE LA MUESTRA.....	19
10.4	GRUPOS DE ESTUDIO	19
10.5	VARIABLES DE ESTUDIO.....	21
10.6	TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	22
10.6.1	<i>Determinación de periodo óptimo de ayuno intermitente en los ratones DBA/1</i>	<i>22</i>
10.6.2	<i>Inducción de artritis en ratones DBA/1</i>	<i>22</i>
10.6.3	<i>Extracción de muestras sanguíneas en ratones DBA/1</i>	<i>22</i>
10.6.4	<i>Evaluación clínica de la artritis.</i>	<i>23</i>
10.6.5	<i>Preparación de los tejidos para histología.....</i>	<i>23</i>
10.6.6	<i>Evaluación histológica de la artritis.....</i>	<i>24</i>
10.6.7	<i>Tinciones de biomarcadores con inmunohistoquímica</i>	<i>25</i>
10.6.8	<i>Extracción de RNA</i>	<i>26</i>
10.6.9	<i>Cuantificación y verificación de calidad e integridad del ARN</i>	<i>27</i>

10.6.10	<i>Hibridación, detección y preprocesamiento de microarreglos de expresión.....</i>	28
10.6.11	<i>Análisis bioinformático.....</i>	29
10.6.12	<i>Retro transcripción (RT).....</i>	29
10.6.13	<i>PCR en tiempo real (qPCR).....</i>	30
10.6.14	<i>Análisis de la cuantificación de citocinas.....</i>	31
10.7	DISEÑO Y PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS	31
11.	ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD	32
11.1	CONDICIONES AMBIENTALES.....	33
11.2	ALIMENTACIÓN E HIDRATACIÓN	34
11.3	VIGILANCIA DE ANIMALES.....	34
11.4	CRITERIOS PARA LA ELIMINACIÓN TEMPORAL O TOTAL DE UN ANIMAL DEL ESTUDIO.....	34
11.5	MÉTODOS DE EUTANASIA	35
12.	RESULTADOS.....	35
12.1	EFFECTO DEL AI SOBRE EL PESO DE LOS RATONES CON AIC.....	35
12.2	EFFECTO DEL AI SOBRE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS DE LA AIC	36
12.3	EFFECTO DEL AI SOBRE LOS PARÁMETROS HISTOLÓGICOS DE LA AIC.....	37
12.4	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA ..	39

12.5	EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN	39
12.6	REGULACIÓN DEL PERFIL TRANSCRIPTÓMICO INFLAMATORIO ARTICULAR.....	41
13.	DISCUSIÓN	54
14.	CONCLUSIÓN	59
15.	REFERENCIAS.....	60



1. RESUMEN

Introducción: La Artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune de carácter inflamatorio, caracterizada por destrucción sinovial. El ayuno intermitente (AI) es un proceso en el cual se limita el tiempo de alimentación, el cual activa vías metabólicas antiinflamatorias, por lo que podría ser un coadyuvante en el tratamiento de la AR. **Objetivo:** Investigar el efecto del AI sobre el mecanismo inflamatorio articular en modelos murinos de artritis inducida por colágeno (AIC), mediante microarreglos de expresión, evaluación clínica e histopatológica. **Métodos:** Se realizó inducción de AIC en 16 ratones macho de la cepa DBA/1, se dividieron en 2 grupos, uno se inició AI de 24h por 4 semanas, la evaluación clínica se realizó midiendo la inflamación en las patas, la histología se evaluó de manera semicuantitativa usando tinción de hematoxilina y eosina (H&E), el transcriptoma se analizó usando el microarreglo expresión y validando mediante la RT-qPCR, con lo que se evaluó el efecto antiinflamatorio del AI. Se utilizó la t de student para comparar las diferencias entre grupos, un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo, en el microarreglo se utilizó ANOVA unidireccional considerando significativo un valor de $p \leq 0.01$. **Resultados:** La incidencia de AIC disminuyó en el grupo con AI, además se encontró una disminución en el daño articular a nivel histológico. El análisis de expresión diferencial arrojó 364 genes sobreexpresados, siendo el más alto Ereg, y 543 genes subexpresados, siendo el más bajo el grupo de MUP, además se encontró una sobreexpresión sobre las vías de síntesis del retinol y la vía de activación alterna de macrófagos con un z-score positivo; siendo las vías relacionadas con la inflamación las más subexpresadas como la activación de células B en lupus eritematoso sistémico (LES) y osteoartritis, además de genes relacionados con la AR como Cd72, Cd79a, Ifna, Il33 y Bglap2. Dentro de los resultados arrojados por el algoritmo bioinformático se relacionan como posibles reguladores centrales a CEBPA, FOXO1, HIF1A, PPARG y PPARA. Se encontró que entre las patologías y funciones biológicas disminuidas por el AI están la respuesta inflamatoria, enfermedades metabólicas, cáncer y patologías



asociadas al sistema osteo-muscular, endocrino, gastrointestinal y reproductivo, a la inversa, se encuentran aumentados el metabolismo de carbohidratos y lípidos, bioquímica de pequeñas moléculas y moléculas de transporte. **Conclusión:** Se encontró que el AI tiene un efecto antiinflamatorio e inmunomodulador importante sobre la AIC, regulando la activación del sistema inmune, sin embargo, es necesario seguimiento del estudio para evaluar el efecto real sobre la AR en humanos.

Palabras Clave: artritis, artritis inducida por colágeno, ayuno intermitente, interleucina-33, microarreglo.



2. ABSTRACT

Introduction: Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory autoimmune disease characterized by synovial destruction. Intermittent fasting (IF) is a process in which feeding time is limited, which activates anti-inflammatory metabolic pathways, so it could be an adjuvant in the treatment of RA. **Objective:** To investigate the effect of Intermittent fasting (IF) on joint inflammatory molecular mechanisms in collagen-induced arthritis (CIA) through DNA microarray and clinical and histopathological evaluations. **Methods:** CIA was induced in sixteen male DBA/1 mice divided into two groups; one received every other day IF for four weeks. The clinical, histological, and transcriptomic analyses, through DNA microarray, were done to evaluate the effect of IF on joint inflammation and remodeling. **Results:** CIA mice with IF show lower arthritis incidence and severity. IF also decreased the histological inflammation and joint damage. DNA microarrays dataset revealed 364 overexpressed and 543 subexpressed genes. The highest over- and subexpressed genes were the Ereg and MUPs, respectively. Retinol biosynthesis and the macrophage alternative activation pathways were associated with a positive z-score. Pathways with negative z-scores were related to the inflammatory process, including systemic lupus erythematosus in B cells and osteoarthritis, in which the Rheumatoid Arthritis (RA)-related genes Cd72, Cd79a, Ifna, Il33, and Bglap2 were found to be decreased. The bioinformatic algorithm identified four central possible regulators: CEBPA, FOXO1, HIF1A, PPARG, and PPARA. In the analysis of diseases and biofunctions, molecular transport, small molecule biochemistry, and lipid and carbohydrate metabolism tended to increase; conversely, organismal injury and abnormalities, inflammatory response, metabolic diseases, cancer, and endocrine, reproductive, gastrointestinal, skeletal, and muscular system disorders, were decreased by IF. **Conclusion:** IF has an anti-inflammatory and immunoregulatory effect on CIA; further research is required to explore a potential additive effect on patients with RA.

Keywords: arthritis; collagen-induced arthritis; fasting; interleukin-33; microarray.



3. MARCO TEÓRICO

3.1 Artropatías inflamatorias

Las artropatías inflamatorias (API) son un grupo de patologías de origen autoinmune, dentro de las que se encuentran las enfermedades reumáticas incluyendo a la artritis reumatoide (AR), la espondilitis anquilosante (EA), la artritis psoriásica (APs) y el resto del espectro de las artropatías seronegativas como la espondilitis juvenil idiopática (EJI). A pesar de que son enfermedades caracterizadas por generar daño articular, no todas lo hacen de la misma manera, ni siguen el mismo cuadro clínico y tampoco tienen el mismo tratamiento y pronóstico. Cada una de ellas tiene sus manifestaciones inflamatorias propias, por ejemplo la APs además de dañar articulaciones interfalángicas distales (AIFD) tiene síntomas extra articulares como es la aparición de placas psoriásicas dérmicas en zonas de fricción como codos o rodillas, mientras que la EA además de la afectación en articulaciones sacroilíacas es una enfermedad la cual puede dar enfermedad inflamatoria intestinal (1–3).

Es bien sabido que los daños inflamatorios articulares y sistémicos, son mediados tanto por mecanismos celulares como los linfocitos y los granulocitos, así como por citocinas inflamatorias como el TNF- α y las IL-1 β , la IL-6; sin embargo, también parte del proceso son las citocinas de actividad antiinflamatoria y de crecimiento como las IL-10 y el TGF- β , las cuales contribuyen al proceso de remodelado articular posterior al proceso inflamatorio, siendo en conjunto la causa de deformidades y limitaciones funcionales de la zona anatómica afectada (1,2,4).

Se ha comprobado que existen mecanismos moleculares y genéticos que se encuentran relacionados directamente con la presencia de cierto tipo de patologías, por ejemplo la relación entre la EA y el gen HLA-B27 (5), o la relación entre la AR y los anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados (APCC) y el factor reumatoide, el cual funciona como marcador inespecífico de la enfermedad (6). Aunado a los factores genéticos los factores ambientales juegan un papel fundamental, que



incluso aun con carga genética preestablecida, pueden condicionar o no la aparición de las API (7).

Dentro de los mecanismos principales está la activación autoinmunitaria de células del mecanismo innato de la defensa como los linfocitos Natural Killer (NK), macrófagos o los neutrófilos (8), contra elementos intra y extracelular, los cuales, posterior a desencadenar toda una compleja respuesta de defensa condicionan complejos de autoanticuerpos, que propician y mantiene el ataque al tejido y la zona anatómica específica de cada patología, dando sus manifestaciones clínicas clásicas. Estas moléculas a su vez sirven con marcadores de identificación bioquímica, como guía para el tratamiento y pronóstico de los pacientes (4,6,9).

A pesar de que se conoce bastante acerca de estas enfermedades, aún son patologías no comprendidas en su totalidad. Se han propuesto modelos los cuales explican su mecanismo de acción, pero ninguno da la respuesta completa. *Xunyao Wu et al.* (1), propone que los linfocitos de la respuesta innata están muy involucrados en los sistemas de inicio de las patologías iniciando la respuesta inmune del huésped ante antígenos propios, esto en relación a tres grupos principales divididos por su estimulación y su acción, el grupo 1 son los Linfocitos NK que producen principalmente interferón (IFN) γ , el grupo 2 el cual produce citocinas proinflamatorias y activadoras de respuesta inmune como las IL-4, IL-5 y por último el grupo 3 los cuales son secretores de inductores de tejido linfoide y moduladores como las IL-17 y la IL-22 (1). Una vez desencadenado el inicio de la patología, se genera una cascada de activación de linfocitos B y T mediante receptores de células B (BCR) y los receptores de células T (TCR) además de los receptores tipo Toll (TLR), lo cual genera una respuesta en su mayoría de células Th1 productoras de TNF- α dando como resultado una inflamación sinovial por una hiperproducción de IL-6 y factores que bloquean a los osteoblastos, por lo que propicia la destrucción del hueso circundante a la articulación afectada (9), por otro lado también existe la producción de IFN- γ , el cual bloquea la producción de IL-1 β ,



disminuyendo la producción de metaloproteinasas de matriz (MMPs) disminuyendo la lesión generada en la articulación (4,6,8,10).

3.1.1 Artritis reumatoide

La AR es una de las enfermedades con mayor compromiso sistémico, en la cual se observa una inflamación de la membrana sinovial, característicamente afectado de manera simétrica las articulaciones(2,4). Su epidemiología depende de la zona y la raza, pero en general se estima una prevalencia de 0.5-1% (11,12). La mayoría de la afectación se ve mediada por la destrucción condral, la erosión generada en el hueso, lo que genera una deformidad articular importante que genera incapacidad a los pacientes; al ser una enfermedad multifactorial no se puede determinar su desencadenante exacto, sin embargo se ha comprobado que existe una relación con el alelo HLA-DR4 (2,4,13). Debido a esta relación, se sabe que la evolución es mediada por células del sistema inmune, ya sea innato y el adaptativo, lo cual genera la infiltración mononuclear en la membrana sinovial, a su vez se genera la activación de células residentes del tejido, como macrófagos y fibroblastos, y producción de mediadores inflamatorios(1,6,13).

La AR genera afectación sinovial, cartilaginosa y ósea circundante de la articulación afectada. Es sabido que en estado normal la membrana sinovial es formada por una capa de tejido conjuntivo laxo y fibroblastos, esta se encarga del recubrimiento, protección y nutrición de las estructuras articulares(3,7). De este modo se determina que la AR genera una infiltración de células inflamatorias, células B, T, células plasmáticas, células dendríticas, mastocitos y granulocitos en menor medida(6), en el sinovio generando su proliferación, a su vez la producción de citocinas genera la lesión ósea y condral (14). Si el proceso se perpetúa se genera un cuadro crónico, en el cual el acúmulo de detritos celulares genera la aparición del pannus y tejido de granulación sinovial que genera invasión circundante y daño articular(2,4,7).



Al ser una enfermedad sistémica la clínica es variable, sin embargo se conoce que la afectación inicial es una poliartritis simétrica en articulaciones pequeñas cursando con dolor articular, patrón inflamatorio y rigidez matutina mayor a 30 minutos, la cual desaparece con el movimiento siendo estos los signos clínicos de inicio de la enfermedad. Mayormente resultan afectadas las articulaciones interfalángicas proximales (IFP) y metacarpofalángicas (MCF) (2). El compromiso de las articulaciones metatarsofalángicas (MTF) es un signo temprano de la enfermedad (4). La tenosinovitis de tendones flexores es una característica que se presenta una vez que la enfermedad se encuentra en un estadio más avanzada generando compromiso en la movilidad y genera debilidad de prensión y contractura digital(4). Una vez que la patología avanzó lo suficiente para generar deformidad los signos clínicos son conocidos como: “deformidad en cuello de cisne” generado por la hiperextensión de las articulaciones IFP con flexión de la articulación interfalángicas distales (IFD), “deformidad en botonero” generada por la flexión de la articulación IFP con hiperextensión de la articulación IFD y por último la “deformidad en z” causada por la subluxación de la primera articulación MCF con hiperextensión de la primera articulación IFP(4,6).

A menudo se considera que la AR es una enfermedad inducida por macrófagos porque dicho tipo de célula es la productora predominante de citocinas proinflamatorias dentro de la articulación. Las citocinas proinflamatorias liberadas por los macrófagos sinoviales comprenden factor de necrosis tumoral (TNF) α y las interleucinas (IL) 1, 6, 12, 15, 18 y 23. Los fibroblastos sinoviales, que constituyen el otro gran tipo celular en dicho microentorno, generan las IL-1 e IL-6 así como el TNF- α ; este último es una citocina indispensable en los aspectos biopatológicos de la inflamación sinovial (1,8,9). Al ser sistémica esta enfermedad se genera un estado inflamatorio sistémico incrementando en sangre los reactantes de fase aguda como lo son la velocidad de sedimentación globular (VSG), la proteína C reactiva (CRP), además genera la producción característica de autoanticuerpos como lo son IgM e



IgG (1,7), y siendo el más relevante para el diagnóstico de la patología son los anticuerpos anti péptidos cíclicos citrulinados (APCC) (2,4).

3.2 Modelos murinos de artropatías inflamatorias

Con fines de investigación, los modelos murinos son una excelente forma para transpolar resultados y comprobar los efectos medicamentosos probables en los humanos, razón por la cual aún en la actualidad son ampliamente usados en el estudio de las artropatías inflamatorias (15,16). En cuanto a los modelos de artropatías murinas se refiere, hay clases especiales de ratones o ratas que son susceptibles a la aparición de la enfermedad, que además desarrollan un cuadro muy similar al humano, tanto a nivel de daño articular, lesión ósea, infiltración tisular, citocinas en líquido sinovial y nivel sistémico, con aumento de citocinas proinflamatorias, aumento en el recuento de mononucleares y polimorfonucleares, además los procesos inflamatorios, los procesos de remodelación y angiogénesis generan la deformación a largo plazo. Dentro de los factores proinflamatorios que más se encuentran presentes son la activación de células presentadoras de antígenos, las cuales mediante la activación de células B y T generan la cascada de citocinas principalmente la actividad de Th1 productoras de TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-21 en su mayoría (17,18).

Al momento de inducir la artritis por fármacos existen varias formas de hacerlo, como lo es la inducción de artritis por pristano (AIP), debido a que desarrollan la artritis de la manera más parecida a la enfermedad en humanos, con daño tisular, articular, y lo especial de esta técnica es que inclusive desarrolla un marcador similar al factor reumatoide, además que es un modelo rápido y relativamente fácil de inducción, por lo cual lo hace un excelente método para estudio, el inconveniente es que se debe de contar con una cepa especial de ratas como las DA (18).

Otro método para estudio de artropatías en modelos murinos es la inducción de artritis por colágeno (AIC) el cual asemeja la enfermedad articular y sistémica, con



un periodo de desarrollo de la enfermedad relativamente corto de 4-10 semanas, siendo bastante efectivo, generando la artritis en casi el 90% de los sujetos de experimentación. Para la AIC se usa colágeno tipo II bovino, con el adyuvante de Freund, el cual es formado a base de micobacterias. Se recomienda que la inducción sea en un esquema en 2 dosis, la inicial usando el adyuvante de Freund completo y el refuerzo en el día 21 con adyuvante de Freund incompleto, el cual es llamado así debido a la carencia de micobacteria, posterior a las 2 dosis el desarrollo de la AIC se tarda aproximadamente 2-4 semanas en aparecer, con un pico máximo aproximadamente a la semana 8 (18–20).

Otro modelo usado con fines de investigación en modelos reumatológicos es la generación de artritis espontánea (SpA), en el ratón DBA/1, cuya confinación en espacios reducidos por al menos 4 semanas, generan una enfermedad que asemeja a la EA a partir de las 12 semanas de edad, la cual es caracteriza por una inflamación leve seguido por osificación endocondral principalmente en las articulaciones IFP de las patas traseras(17). El trasfondo molecular es la activación de mononucleares, las cuales generan la cascada de IFN- γ , IL-6 y TGF- β , generando la remodelación tisular e inflamación controlada dando como resultado la osificación y fusión articular (21).

3.3 Ayuno intermitente (AI)

El alimento es una de las bases para la vida de los seres vivos ya que sirve como fuente de energía para realizar sus actividades diarias y además para generar reservas de energía, las cuales son usadas durante el tiempo en el cual el alimento escasea, como lo son la hibernación o los periodos de ayunos prolongados, ya sea por propia convicción, con fines religiosos o inducidos. En los seres vivos se sigue en su mayoría el mismo proceso, se da la alimentación, el proceso de digestión, seguido de esto viene el periodo de ayuno, el cual varía dependiendo de los hábitos alimenticios del individuo, en el cual si el tiempo entre alimentos es corto no sufrirán un cambio importante en la homeostasis del sistema, en cambio sí son un poco más



prolongados, el cuerpo tiene que reajustar su gasto energético y en general tiene un déficit calórico importante (22–24).

El AI es un periodo de abstinencia voluntaria del consumo de alimentos o líquidos durante un tiempo preestablecido para generar un déficit calórico, mejorar en el metabolismo celular e inclusive balancear el consumo calórico; este tiene que ser guiado dependiendo de los deseos y metas de cada paciente en particular (25,26).

3.3.1 Efectos fisiológicos del ayuno intermitente

Es bien sabido que la restricción calórica generada por el AI contribuye de manera significativa en la pérdida de peso; pero, además, se ha demostrado que favorece la disminución del riesgo cardiovascular, el índice aterogénico, el metabolismo lipídico, el funcionamiento orgánico y el uso de los hidratos de carbono(27). No obstante, los mecanismos por los cuales el ayuno ofrece estos beneficios no han sido completamente comprendidos (25,28,29).

Estudios previos han demostrado que el AI tiene un efecto positivo en el metabolismo ya sea en modelos animales, así como en humanos (27,30), aunque durante el tiempo de actividad el consumo de alimento sea un poco mayor que el de los grupos control, esto genera una activación y fluctuación en las enzimas encargadas de la regulación metabólica y de energía durante el día(29). Dentro de los cambios moleculares iniciales está una hiperfosforilación de la proteína ERK1/2, lo cual genera un aumento de la lipólisis, sumado con la activación de la proteína PPAR- γ 1, FAS y ACC1, los cuales estimulan la transcripción de factores de ligandos a tejido adiposo aumentando el recurso energético mediante la liberación de ácidos grasos libres. Adicionalmente, el AI ha mostrado reducir la resistencia a la insulina y la activación del PPAR α , el cual es encargado del inicio de la β -oxidación mediante los factores de transcripción ACAD1 y ACOX1. Adicionalmente, este ayuno genera un cambio en el proceso termogénico mitocondrial aumentando la expresión de la proteína de desacoplamiento mitocondrial 1 (UCP1) (27,30,31), la cual forma parte



del sistema de transporte de electrones generando un aumento en la síntesis de energía, además de disminuir la cantidad de tejido adiposo blanco con la activación de los receptores β 3-adrenérgicos principalmente generando un aumento en el consumo de oxígeno en la cadena de electrones gracias a la activación de las creatinina cinasa mitocondrial 1 y 2 (CKMT1 y CKMT2) (30–32).

En general el resultado es una mejoría en la flexibilidad metabólica de los pacientes generando un cambio en el uso de fuentes de energía variado, alternando entre la glucosa durante los estados de alimentación a principalmente lípidos durante los periodos de ayuno, llevándonos a una mayor eliminación de tejido adiposo subcutáneo, mesentérico y perivisceral (27,29–31,33,34). Con base en esta evidencia determinamos que además de los efectos moleculares del AI, la disminución en el riesgo cardiovascular se ve normada por un control en el peso mucho más óptimo reduciendo el índice de masa corporal (IMC) (28,30,34).

3.3.2 Efectos antiinflamatorios del ayuno intermitente

Dentro de los efectos más controversiales del AI es su efecto antiinflamatorio. Se ha demostrado una reducción del estrés oxidativo (EO), disminuyendo los factores intracelulares participantes en la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) como la óxido nítrico sintasa (NOS), mieloperoxidasa (MPO), así como una reducción significativa en la producción del factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), que disminuye la actividad de las enzimas encargadas de la producción de EROs. Asimismo, se ha asociado el AI a una disminución considerable de los niveles de TNF α , IL-1, IL-6, la proteína C reactiva (CRP) así como el marcador de EO malondialdehido (MDA) (34–36).

Otro de sus efectos más importantes relacionados a la inflamación, es que a nivel celular genera una respuesta del sistema inmune mucho más adecuada, esto debido a que los procesos fisiológicos involucrados en la activación y señalización no se encuentran hiperactivados por un estado proinflamatorio generado por el



tejido adiposo y la resistencia a la insulina secundaria y la disminución de la producción de adipocinas y adiponectinas encargadas de la activación de las células de la respuesta inmediata o específicas (30–32,34,36).

3.4 Ayuno intermitente en artropatías inflamatorias

Los procesos de enfermedad de origen autoinmune como lo es la AR involucran la alteración del metabolismo celular especialmente de los linfocitos(32). Uno de los ejemplos más recientes es la deficiencia en los linfocitos T CD4⁺ de la enzima 6-fosfofructo-2-cinasa/fructosa2,6-bifosfonatasa 3 (PFKFB3) (37), la cual es de las enzimas de paso-limitante en la vía glucolítica, lo que hace que la glucosa se vea obligada a pasar a la vía de las pentosas fosfato para ser metabolizada, generando un aumento en la nicotidamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) aumentando la cantidad de ERO, lo cual se ve directamente relacionado con la severidad de inflamación articular(38). Otro de los efectos de la deficiencia de la PFKFB3 es el aumento en la rapidez del consumo de los telómeros y la pérdida de CD28, lo que genera una deficiencia en la reparación del DNA haciendo a las células vulnerables contra la mutación, debido a que el AI genera una mejora en la resistencia a la insulina y un switch en el uso de vías alternas de energía este proceso se ve aminorado especialmente durante el tiempo de ayuno, pero el regreso a los niveles basales es relativamente rápido una vez que se termina el ayuno (39–41).

Otro de los mecanismos de importancia es que el AI modula la relación entre IL-12/IL-10 generando una disminución de la actividad de los linfocitos Th17 y Th1 disminuyendo la cantidad circulante y local de IFN- γ , IL-17 y TNF- α y CRP, aunado a esto genera la inducción de apoptosis mediante FAS/FASL de los linfocitos autoreactivos, dando lugar a la producción de linfocitos sin estímulo, lo que a nivel global mejora el estado inflamatorio de los pacientes (37,41).



3.5 Modelos murinos de ayuno intermitente.

El AI en modelos murinos debe considerar que el ciclo circadiano es diferente al del humano con ciclos de 12h/12h luz/oscuridad de forma invertida a los humanos(42). En el modelo de AI más usado en la experimentación con ratones, los animales se someten a ayunos de 24h, seguidos de 24h de dieta *ad libitum*, durante un periodo mínimo de 1 semana (22,43). Otro de los modelos de ayuno en murinos, se realiza restringiendo la alimentación durante 8h durante en la fase de inactividad de los animales, seguido de 14h de alimentación alta en grasas (30).



4. ANTECEDENTES

El efecto benéfico del AI se ha estudiado tanto en modelos murinos así como en humanos bajo ciertas condiciones como el Ramadán, en la Tabla 1 se resumen los antecedentes particulares de este estudio.



Tabla 1. Antecedentes particulares

Autor	Sujetos de estudio	Intervención	Grupos de estudio	Inducción de ayuno	Resultados
Samvelyan et al (junio, 2021) (44)	Ratones macho C57BL/6 wild-type de 16 semanas	Aplicación de carga mecánica sobre las articulaciones de la rodilla en los grupos de estudio.	Grupo con AI y carga mecánica	Ayuno 16:8h durante la noche durante un periodo de 2 semanas	La neoformación ósea fue de mayor y de mejor calidad en los grupos con AI con carga mecánica, al contrario de lo que sucede en los grupos sin ayuno
			Grupo control con AI sin carga mecánica.		Se encontró relación entre la carga mecánica, el ayuno y hormonas de regulación ósea y metabólicas (leptina, ghrelina, insulina y GIP), generando una regulación al alta durante los periodos de ayuno, pasando las 12h
Cignarella et al. (junio, 2018) (42)	Ratones hembra C57BL/6J de 7 semanas	Aplicación de glicoproteína de mielina de oligodendocito con adyuvante de Freund's y toxina pertussis para generar encefalomiелitis experimental autoinmune.	Grupo con AI	Ayuno de 24h alternado por un periodo de 4 semanas	El grupo con AI tuvo una incidencia del 70% en el desarrollo de síntomas mientas que el control fue del 100%
			Grupo sin AI		El grupo con AI demostró un menor infiltrado inflamatorio, reduciendo la producción de IL-17 e IFN-γ, además disminuyendo la desmielinización en la médula espinal Aumento el grupo de células Treg en tejido linfoide en el grupo con AI
Wilson et al. (marzo, 2018) (45)	Ratones macho y hembras C57BL/6 de 8 semanas	Intervalos de ejercicio de alta intensidad	Grupo obeso de inicio	Ayuno por 48h en un ciclo de 8 días por 12 semanas	Se reporta una disminución del peso y la cantidad de grasa en los grupos con AI
			Grupo control		Aumento en los niveles basales de glucosa en los grupos con AI
			Grupo con AI		Los niveles de insulina basal no mostraron cambios entre los grupos, sin embargo, el HOMA-IR se vio afectado en los grupos con AI Y ejercicio
		Dieta alta en grasas y agua adicionada con azúcar por 12 semanas, posterior creación de grupos.	Grupo con ayuno ejercicio de alta intensidad		La fuerza muscular se vio ligeramente mejorada en el grupo con ejercicio y AI
Grupo con AI y ejercicio de alta intensidad					
Nessib et al. (febrero 2020) (41)	Pacientes con enfermedades reumáticas	AI	Pacientes con diagnóstico de AR o SpA que realizarán ayuno del Ramadán	Ayuno diurno ≈16h.	El AI tiene efectos benéficos sobre la actividad de la AR según las escalas DAS 28 La disminución del score en las escalas BASDA1 y ASDAS, fue estadísticamente significativa



5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las API aún siguen en constante investigación, debido a que son un grupo muy heterogéneo de patologías, de las cuales no se tiene una claridad total en cuanto a la etiología y fisiopatología se trata, al día de hoy se intenta dar respuesta a los mecanismos celulares y moleculares que se ven involucrados a la hora de generar una afectación articular específica y la respuesta sistémica que estas desencadenan condicionando el cuadro clínico observable en los pacientes con éstos diagnósticos (4).

Se sabe que las API tienen una prevalencia bastante elevada a nivel mundial un ejemplo de ello es la AR de aproximadamente 1% (6,11) de prevalencia, debido a que es una enfermedad que afectan a la población generalmente en la etapa productiva de sus vidas y con el fin de aminorar la sintomatología en la fase activa de la enfermedad, reducir las consecuencias de la patología, disminuir la afectación social, laboral y psicológica, (46–48).

El AI ofrece un estado antiinflamatorio, en el cual la activación de las células de la defensa se ve ralentizado (31,41), dando como resultado un estado en el cual la enfermedad se ve disminuida de forma natural (32,35).

Con el fin de generar un aumento global en la calidad de vida de los pacientes afectados, se realizan exhaustivas revisiones y ambiciosos estudios para dar solución a este grupo de enfermedades abordando el uso de medicamentos y procedimientos, dentro de ellos es necesario abordar mecanismos coadyuvantes al tratamiento como lo puede ser el AI con el fin de reducir el efecto inflamatorio de las enfermedades reumatológicas.



6. JUSTIFICACIÓN

El efecto del AI en las enfermedades reumatológicas, como la AR y la SpA, ha sido escasamente investigado; sin embargo, tanto en condiciones fisiológicas como en otras patologías se le han reconocido efectos antiinflamatorios importantes (37,41,49).

Se ha visto un efecto antiinflamatorio sistémico al disminuir la producción de citocinas proinflamatorias por el tejido adiposo generando una mediación en la respuesta inmune de los pacientes, además generando una senescencia celular y guiando a las células previamente activadas a la apoptosis mediante FAS/FASL, aunado al alza de los procesos de regulación por los linfocitos Treg disminuyendo la migración celular hacia los tejidos blanco de la patología (24,31,32,41,49).

La exploración de la influencia del AI sobre el proceso patogénico de la artritis permitirá identificar sus posibles beneficios antiinflamatorios a nivel articular y proponerlo como una estrategia adicional al tratamiento actual de los pacientes con enfermedades reumatológicas (32,41,49).



7. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto del AI sobre los parámetros clínicos, histológicos y transcriptómicos articulares en ratones DBA/1 con AIC?

8. HIPÓTESIS

El AI modifica la evolución clínica, histológica y transcriptómica de los ratones DBA/1 con AIC.

9. OBJETIVOS

9.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del AI sobre los parámetros clínicos, histológicos y transcriptómicos articulares en ratones DBA/1 con AIC.

9.2 Objetivos Específicos

- A. Generar el modelo de AIC en ratones DBA/1.
- B. Determinar y aplicar la estrategia de AI en los ratones con artritis.
- C. Evaluar la evolución clínica de la artritis inducida por el ayuno durante el periodo experimental.
- D. Valorar los cambios histológicos articulares inducidos por el ayuno mediante tinciones colorimétricas.
- E. Analizar la expresión de proteínas en tejido mediante tinciones de inmunohistoquímica
- F. Determinar los cambios transcripcionales articulares inducidos por el ayuno a través de microarreglos de ARN.
- G. Validar los cambios en los mediadores inflamatorios inducidos por el ayuno por RT-qPCR.



10. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1 Diseño

El diseño experimental se basará en la Figura 1, se indujo la AIC y posterior a ello se separaron en el grupo control (C) y el grupo con AI (AI), este grupo se le administró AI de manera alterna como se explica en el apartado 8.6.1, fueron sometidos a un periodo de estudio de 4 semanas.

10.2 Sujetos de estudio

Ratones macho de la cepa DBA/1 de entre 8 y 12 semanas de vida al inicio del estudio, los cuales serán proporcionados por el bioterio de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua, se mantendrán en jaulas de 34.5 X 49 X 17 cm en una habitación a una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, con un ciclo alternado de 12 h luz/oscuridad, alimentados con dieta estándar para ratón de laboratorio y agua destilada.

10.3 Tamaño de la muestra

Se incluyeron 16 ratones con las características descritas en el apartado anterior.

10.4 Grupos de estudio

Los ratones se dividieron aleatoriamente en 2 grupos de 8 ratones cada uno (Figura 1), uno de los cuales recibió AI (experimento) y el otro no (control).

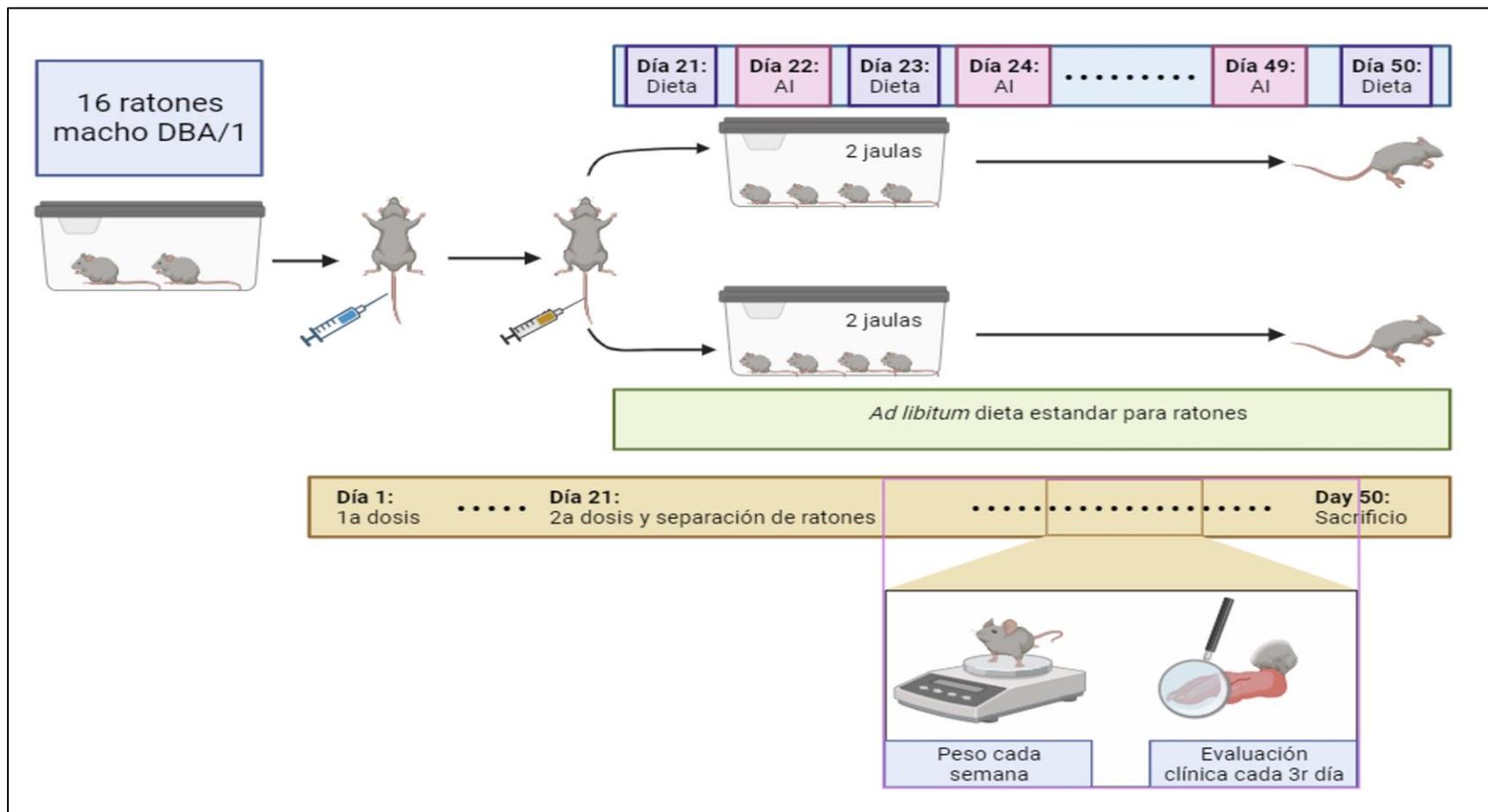


Figura 1. Diseño experimental. Se Usan 16 ratones macho de la cepa DBA/1 para el experimento, el día 1 se inicia la inducción con colágeno y adyuvante completo de Freund, al día 21 se da la dosis de refuerzo con adyuvante incompleto y se hace la aleatorización de los ratones, el grupo AI se separó en 2 jaulas con 4 ratones y se inició el proceso de AI cada 24h por 29 días, el grupo control de igual forma con 2 jaulas con 4 ratones, se continua con dieta ad libitum durante el periodo completo; durante este periodo se realiza pesaje semanal y evaluación clínica cada 3r día, el día 50 se realiza el sacrificio de ambos grupos.



10.5 Variables de estudio

Las variables de estudio se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Variables de estudio

Variable	Definición operacional	Indicadores	Escala de medición	Forma de medir la variable
Variable independiente				
Ayuno intermitente.	Uso de AI en los grupos, contemplando lo previamente mencionado 24h de ayuno por 24h de dieta <i>ad libitum</i>	Aplicación del ayuno en los ratones cada 24h por 4 semanas	Nominal: 0: No ayuno intermitente 1: Ayuno intermitente	Visual
Variables dependientes				
Artritis clínica	Hinchazón y anquilosis de las articulaciones con previa inducción mediante el colágeno.	Nivel de hinchazón y anquilosis	Nominal: 0: Ausente 1: Inflamación en un dedo 2: Inflamación de 2 o más dedos o del cojinete plantar o palmar 3: Inflamación masiva en tobillo 4: Inflamación de la extremidad y anquilosis	Escala visual
Artritis histológica	Infiltrado infamatorio	Nivel de infiltrado leucocitario	Nominal: 0: Ausente 1: Leve 2: Moderado 3: Severo	Observación microscópica de tinciones de H&E
	Hiperplasia sinovial	Aumento en el número de fibroblastos presentes en la membrana sinovial		
	Reducción del espacio articular	Reducción del espacio de la articulación	Nominal: 0: Ausente 1: Presente	
Expresión de proteínas inflamatorias	Aparición de tinción posterior al proceso de inmunohistoquímica de los marcadores seleccionados	Cantidad de coloración en pixeles de cada imagen de las articulaciones con respecto a los marcadores seleccionados	De razón: Densidad óptica	Procesamiento de imágenes mediante el programa ImageJ
Genes expresados	Cantidad de genes que fueron trascritos a RNA	Genes que fueron sobre e infraexpresados partiendo de las articulaciones sacras, del carpo y del tarso	De razón: Número de genes y niveles de expresión diferencial	Medición de expresión en los resultados del microarreglo
Vías de señalización	Genes asociados a vías de señalización específicas	Vías sobre, infraexpresadas o silenciadas	De razón: Número de vías y niveles de expresión Nominal: nombre de las vías.	Análisis bioinformático del microarreglo
Procesos Biológicos	Agrupaciones génicas asociadas a procesos biológicos de interés	Actividad que se ven sobre, infraexpresada o silenciada.	De razón: Número de procesos y niveles de expresión Nominal: nombre de los procesos.	Análisis bioinformático del microarreglo



<p>Cuantificación de marcadores inflamatorios</p>	<p>Generar una amplificación de las cadenas de cDNA con el fin de cuantificar la expresión de los marcadores de interés</p>	<p>Amplificación del gen responsable de producir la proteína de interés</p>	<p>De razón: Cuantificación relativa.</p>	<p>RT-PCR, método $\Delta\Delta Ct$</p>
--	---	---	---	--

10.6 Técnicas y procedimientos

10.6.1 Determinación de periodo óptimo de ayuno intermitente en los ratones DBA/1

Se utilizó AI en días alternos (Figura 1), 24h de ayuno por 24h de dieta *ad libitum*, durante un periodo de 4 semanas (42,50).

10.6.2 Inducción de artritis en ratones DBA/1

La metodología general de inducción de AIC se explica en la figura 1; los sujetos de estudio fueron alojados en las condiciones óptimas antes descritas. Para la inducción de la artritis según lo reportado por *Brand et al.* (19), se realizó la emulsificación del colágeno tipo II bovino, el cual es preparado a 4mg/ml disuelto en ácido acético glacial 0.05M, con adyuvante de Freund completo (18,19); se administró 50 μ l de manera intradérmica en la base de la cola, la segunda dosis se aplicó 21 días posteriores a la primera dosis, misma preparación de colágeno, salvo que se emulsificó con adyuvante de Freund incompleto (51,52), se colocó de forma intradérmica, 1 cm por debajo de la inyección anterior, igualmente 50 μ l, ambas dosis fueron administradas bajo protocolo de anestesia con isoflurano en cámara (53).

10.6.3 Extracción de muestras sanguíneas en ratones DBA/1

Las muestras de sangre se obtuvieron los días 4 y 28; la primera toma de muestra se recolectó mediante un corte en la cola y recolectadas en tubos eppendorf® de 1.5ml, obteniendo un mínimo de 100 μ l de sangre total, la muestra correspondiente al día 30 posterior a la intervención, se realizó mediante punción cardíaca con



jeringa de insulina de 1ml con aguja 27G x 13mm, obteniendo la mayor cantidad posible de muestra para su procesamiento posterior.

10.6.4 Evaluación clínica de la artritis.

A partir del día 21 se inició la evaluación clínica con una escala de 0-4 en cada extremidad, con un total de 16 puntos, en la cual el 0 corresponde a una extremidad sana y 4 una extremidad completamente inflamada y anquilosada (tabla 3, figura 2), la evaluación se realizó por 2 observadores independientes 2 veces a la semana posterior a la segunda dosis de colágeno y se continuo hasta terminar la intervención con AI.



Figura 2. Evaluación clínica de la artritis (19).

Tabla 3. Puntaje para la evaluación de artritis clínica

PUNTUACIÓN	GRADO DE SEVERIDAD
0	No hay evidencia de edema o eritema (Sin inflamación)
1	Inflamación sólo en 1 dedo
2	Inflamación en 2 o más dedos sin compromiso del tobillo
3	Inflamación completa del cojinete plantar y el tobillo
4	Inflamación de toda la extremidad con deformidad

10.6.5 Preparación de los tejidos para histología

Los ratones se sacrificaron utilizando una sobredosificación de isoflurano, se cortaron las extremidades de importancia, luego la piel se le retiró, se fijó en formaldehído al 10% en PBS 1X a temperatura ambiente, en un volumen de 50 veces el volumen del tejido por un periodo de 24h.



Una vez terminado el proceso previo, la extremidad entró a proceso de decalcificación ósea, el cual se realizó con ácido nítrico al 5% de aproximadamente 100 veces el volumen del tejido, con recambio de solución cada 12h con un tiempo de decalcificación de 24h en total, al término las piezas se sumergieron en solución de amoniaco al 0.2% por 2h, con posterior se lavó con agua corriendo por otras 2h, se colocaron las piezas individualmente en casetes Tissue-TEX para finalizar pasaron al procesador del tejido.

A continuación, las piezas fueron procesadas en el equipo STP-120 (Microm) por 12h, en el cual se realiza la deshidratación del tejido con etanol en concentración creciente 96-100%, posteriormente clarificados con xileno y finalmente colocadas en parafina por 4h. Se utilizarán cortes de 3 μ m en el microtomo con retracción HM325 (Microm), los tejidos serán colocados en portaobjetos cargados (X-tra Adhesive precleaned micro slides, Leica) para favorecer la adhesión del tejido.

10.6.6 Evaluación histológica de la artritis

Las laminillas fueron colocadas en el horno para desparafinización por 5 min a 60°C, luego se deshidrató el tejido bañándolo en xileno por 5 min, nuevamente se sumergió en xileno por 5 minutos más, continuaron 2 baños con alcohol absoluto de 5 minutos cada uno, siguiendo 2 baños con alcohol al 96% y después se enjuagó con agua corriendo por 1 minuto, aquí termina el proceso de deshidratación y se inició la tinción de la muestra, se embebió en hematoxilina por 10 minutos, inmediatamente se enjuagó con agua corriente por 5 minutos, pasó a un baño de 2 minutos en alcohol ácido al 0.3%, el cual es fabricado con alcohol absoluto y ácido acético, después se volvió a enjuagar con agua corriente por 3 minutos, posteriormente se bañó la laminilla en agua amoniada por 1 minuto, se enjuagó nuevamente por 3 minutos y se sumergió en el la eosina por 30 segundos para generar contraste, en seguida se enjuagó por 2 minutos más, entró al proceso de rehidratación, donde se dieron 30 enjuagadas con alcohol al 96%, siguiendo otros 15 enjuagues con alcohol absoluto, se finalizó con dos baños de xileno de 2 minutos



cada uno, posterior a esto se colocó resina (Entellan, Merck) y cubreobjetos y con esto se terminó el proceso de tinción con H&E.

Las tinciones de H&E se observaron en el microscopio óptico (Axiostar plus, Zeiss) y se evaluaron de manera semi-cuantitativa la inflamación en los tejidos mediante la descripción de los indicadores infiltrado inflamatorio, hiperplasia sinovial, erosión ósea y cartilaginosa, entesitis, neoformación condral y ósea, en una escala de 0-ausente, 1-leve, 2-moderado y 3-severo además de los indicadores de reducción del espacio articular y anquilosis en una escala 0-ausente y 1-presente.

10.6.7 Tinciones de biomarcadores con inmunohistoquímica

Para las tinciones con inmunohistoquímica (IHQ) fueron utilizadas laminillas obtenidas de los cortes de los bloques, para el proceso desparafinando la muestra se colocó en el horno a 60°C por 5 minutos, luego se pasó a baños de xileno en 2 ocasiones por 5 minutos, después pasó a 5 baños en alcoholes en diferentes concentraciones, absoluto, al 96%, al 80%, al 70% y por último al 50%, enseguida se enjuagó por 6 minutos en agua destilada; posteriormente se inició la recuperación antigénica colocando en el tejido solución de trabajo de tripsina, al 0.5% por 20 min en cámara húmeda a 37°C, se reposó por 10 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente, se pasó a solución de lavado por 6 minutos, una vez realizado el proceso de lavado se permeabilizó el tejido, para ello, se colocó en solución Tritón x-100 al 0.2% diluida en Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) 1X por 30 minutos en cámara húmeda, siguió solución de lavado bañando al tejido por 9 minutos, inmediatamente se inició el bloqueo colocando solución de bloqueo con albúmina bovina sérica (BSA) al 1% en PBS 1X por 30 minutos a 37°C en cámara húmeda, se sumergió en solución de lavado por 15 minutos, posterior a esto se inhibió la peroxidasa colocando el tejido en agua oxigenada por 10 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente, se continuó con solución de lavado por 9 minutos, colocó el anticuerpo primario y se incubó en una dilución 1:200 en BSA 1% en PBS 1X pH de 7.4 con suero humano al 1% por 1 hora a temperatura



ambiente, se lavó por 15 minutos en solución de lavado, luego sigue el anticuerpo secundario, el cual se incubó en dilución 1:800 en BSA 1% en PBS 1X pH 7.4 por 30 minutos a 37°C, se pasó a solución de lavado por 15 minutos, entró a la incubadora por 5 minutos a 37°C con estreptavidina peroxidasa (Streptavidin Protein, HRP; Thermo Scientific™) a una dilución 1:800 en BSA al 1%, se lavó por 15 minutos en solución de lavado, luego se aplicó la Diaminobenzidina (DBA) (SIGMAFAST™ 3,3'-Diaminobenzidina tabletas; Sigma-Aldrich) en cámara húmeda por 10 minutos, se lavó por 6 minutos y se pasó al proceso de montaje en el cual se bañó con alcohol al 96% por 3 minutos, 2 baños de alcohol absoluto de 3 minutos cada uno, 2 baños de xileno de 5 minutos cada uno, se colocó resina (Entellan, Merck) y cubreobjetos.

Las tinciones de IHQ, de igual forma, se revisaron en el microscopio óptico (Axiostar plus, Zeiss), se realizó la evaluación mediante el programa ImageJ 1.52p, usando el plug-in para procesamiento de inmunohistoquímica y extracción de tinción DBA, donde se midió el área ocupada por la tinción y la intensidad por pixeles de cada laminilla.

10.6.8 Extracción de RNA

La expresión de genes diferenciales entre ratones DBA/1 con artritis inducida por colágeno con o sin AI se evaluó mediante el análisis de la expresión de ARN en las articulaciones de patas mediante microarreglos de ADN. Los tejidos utilizados se extrajeron y conservaron en nitrógeno líquido después de su disección y posteriormente almacenados en el ultracongelador a -80°C hasta el momento de su procesamiento.

De los tejidos se obtuvo el ARN total empleando el kit RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN)® de acuerdo con las indicaciones propias del kit de extracción. Los tejidos se pulverizaron en nitrógeno líquido con la ayuda del mortero y pistilo, posteriormente se colocó el polvo obtenido en un microtubo de 1.5 ml y se



homogenizó con 1ml de QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN) y 1 μ l de Glicógeno (Roche Cat. 10 901 393 001), se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posterior a ello se agregaron 200 μ l de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos, se realizó incubación nuevamente a temperatura ambiente por 2-3 minutos y se pasó a centrifugación a 12.000 xg durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente se transfirió la fase acuosa a un nuevo microtubo de 1.5 ml y se agregaron 600 μ l de etanol al 70% se mezcló por vórtex. De este tubo, se transfirieron 700 μ l a la columna RNeasy Mini spin, se pasó a la centrífuga por 15 segundos a 8,000xg a temperatura ambiente y se descartó el flujo del tubo de colección. Se repitió este paso hasta completar el pase de todo el líquido por la columna. Se agregó a la columna 700 μ l de Buffer RW1, se centrifugó por 15 segundos a 8000xg a temperatura ambiente y se descartó el flujo del tubo de colección. Se agregó 500 μ l de Buffer RPE a la columna, se centrifugó nuevamente por 2 minutos a 8,000xg y se descartó el fluido del tubo de colección. Se colocó la columna en un nuevo tubo de colección y se pasó a centrifugación a máxima velocidad por 1 minuto. Posteriormente la columna se colocó en un tubo de 1.5 ml, se le agregó 30 μ l de agua libre de RNAsas y se centrifugó por 1 minuto a 8,000xg. El ARN eluido se almacenó a -20°C hasta su uso.

10.6.9 Cuantificación y verificación de calidad e integridad del ARN

La cantidad de ARN purificado se cuantifica mediante el uso del fluorómetro de Invitrogen Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific) ® según sus indicaciones; se utilizó la calculadora de reactivos incorporada al sistema para determinar la cantidad de Qubit™ dye y buffer requerido en la preparación de la solución de trabajo para nuestros estándares y muestras. Se preparó la solución de trabajo diluyendo 1 x n μ l de Qubit™ reagent en 199 x n μ l de Qubit™ Buffer. Para la preparación de los estándares se agregó en cada microtubo 10 μ l de estándar 1 y 10 μ l de estándar 2 respectivamente a 190 μ l de solución de trabajo. Para la preparación de las muestras se agregó 1 μ l de muestra a 199 μ l de solución de trabajo en cada microtubo correspondiente. Se mezcló mediante vórtex cada microtubo durante 2-3



segundos y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se fijó los valores estándar en el fluorómetro y se realizó la lectura de los datos de nuestras muestras.

10.6.10 Hibridación, detección y preprocesamiento de microarreglos de expresión.

Se obtuvieron 16 muestras de RNA, de las cuales 8 son del grupo control y 8 del grupo AIC. Cada grupo se dividirá en 2 pools de 4 muestras tal como se expresa en la tabla 4:

Tabla 4. Distribución de microarreglos de RNA grupos AIC.

Grupo	No. De microarreglos
Control	2 (cada uno de un pool de 4 muestras)
AIC	2 (cada uno de un pool de 4 muestras)

El análisis de transcriptoma completo se realizó usando los microarreglos Clariom D de ratón (Affymetrix GeneChip) siguiendo las instrucciones del fabricante, los cuales se corrieron en la unidad de Affymetrix del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Brevemente, la metodología a seguir fue la siguiente: el kit Affymetrix GeneChipWT Pico se usó para la preparación del cDNA y su marcaje con biotina. El cRNA se purificó usando el protocolo de esferas magnéticas de Affymetrix. Se utilizaron los kits Affymetrix GeneChip™ Hybridization y Wash and Stain para el procesamiento del microarreglo. Después, los microarreglos se incubaron por 16 horas en el horno de hibridación Affymetrix GeneChip 645^a 45°C con rotación a 60RPM. La fluorescencia se amplificó agregando anti-estreptavidina biotinilada y una alícuota adicional de tinción de estreptavidina-fivoeitrina. Con la que se colectó la señal de fluorescencia se utilizó un escaner confocal (Affymetrix Gen-eChip Scanner 3000 7G plus) a una resolución de 3µm después de una



excitación de 570nm. Al final, se obtuvo el promedio de la señal de dos escaneos secuenciales para cada microarreglo.

10.6.11 Análisis bioinformático.

Para el análisis posterior se empleó el software Partek® Genomic Suite (GS)® v7.20.0831. Todas las muestras se normalizaron mediante el método Robust Multiarray Average (RMA), que incluye la corrección del fondo, la normalización y el cálculo de los valores de expresión. El análisis de la expresión diferencial se realizó mediante ANOVA unidireccional. Los genes expresados diferencialmente (DEG) se seleccionaron entre los grupos en función de un cambio \log_2 pliegue absoluto (\log_2FC) $>1,5$ o $< -1,5$, y la tasa de falsos descubrimientos de Benjamini y Hochberg (54) para tener en cuenta las pruebas de hipótesis múltiples. Los genes con un valor p ajustado $<0,01$ se consideraron significativos. El conjunto de datos de microarrays se registró en el Gene Expression Omnibus (GEO) de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con el número de acceso GSE242986.

Se utilizó el análisis de enriquecimiento con QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (IPA) para evaluar la relevancia biológica de los DEG. En el IPA se obtuvo el análisis e integración de las interacciones directas proteína-proteína centradas en la asociación funcional y su regulación aguas abajo, seleccionando las interacciones con mínima confianza (puntuación de interacción $> 0,5$) y considerando la activación o inhibición de la vía por la puntuación z de cada molécula.

10.6.12 Retro transcripción (RT)

Para este proceso se utilizó el kit comercial SensiFast™ cDNA Synthesis Kit (Meridian Bioscience, Cincinnati, OH, U.S.A.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Al conocer las concentraciones de ARN de cada muestra en el equipo Qubit 4 se procedió a calcular las cantidades necesarias de Primers, dNTP mix y H_2O . Se estableció como volumen total de cada reacción un total de 10 μl (recomendación del fabricante).



Posteriormente estas reacciones entraron a una incubación de 65°C por 5 min en el termociclador 2720 Thermal Cycler (applied biosystems, Foster City, CA, USA) y después 1 min en el hielo. Se generó un mix maestro con: 5x TransAmp buffer (4µl), Transcriptasa reversa (1µl), se aforó a 20µl con agua grado biología molecular por cada una de las muestras, para su posterior integración a cada reacción de muestra individual. Luego, se incubaron los mix nuevamente en el 2720 Thermal Cycler con el proceso mostrado en la tabla 5. Al terminar el proceso de incubación se centrifugaron brevemente, terminando el proceso de incubación, se aforaron cada muestra con agua grado biología molecular de Invitrogen (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MS, USA). Una vez terminado el proceso como resultado obtuvimos muestras de ADNc para el proceso de qPCR.

Tabla 5. Programa de incubación en termociclador 2720 Thermal Cycler

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Alineamiento de primers	25	10
Transcripción reversa	42	15
Transcripción reversa para RNA complejo	48	15
Inactivación	85	5

10.6.13 PCR en tiempo real (qPCR)

Una vez obtenido el ADNc por el proceso de retro transcripción se llevó a cabo la amplificación de las secuencias conocidas de los genes constitutivos. Los genes utilizados fueron lo más relevantes en el microarreglo de ADN, dentro de ellos fueron: proteína ósea gamma- carboxiglutamato (Bglap)2, receptor de interleucina (Il)1 (r)2, Il33, clúster de diferenciación (Cd)36 y epiregulina (Ereg); la temperatura de alineación y cantidad de primers fue estandarizada y se describe en la Tabla 6 para el termociclador de tiempo real QuantStudio 3 de (Thermo Fisher Scientific) ® para los marcadores de importancia utilizando genes de referencia para corroborar la correcta amplificación de los ácidos nucleicos, se utiliza el gen de referencia de la proteína ribosomal L (Rpl)13, (21).



Tabla 6. Genes utilizados para validación. BGLAP2: proteína ósea gamma-carboxiglutamato 2, IL-1R2 receptor de interleucina1 R2, IL33: Interleucina 33, CD36 clúster de diferenciación 36 y Ereg: epiregulina.

Gen		Secuencia (5'-3')	Código de GenBank	Conc. final (mM)	T° alin. (°C)
Bglap2	<i>Fw</i>	CTGACCTCACAGATGCCAAGC	NM_001032298.3	0.5	54
	<i>Rev</i>	TGGTCTGATAGCTCGTCACAAG			
CD36	<i>Fw</i>	ATGGGCTGTGATCGGAACTG	NM_001159556	0.4	60
	<i>Rev</i>	GTCTTCCAATAAGCATGTCTCC			
Ereg	<i>Fw</i>	CTGCCTCTTGGGTCTTGACG	NM_007950	1	50
	<i>Rev</i>	GCGGTACAGTTATCCTCGGATTC			
Il1r2	<i>Fw</i>	GTTTCTGCTTTCACCACTCCA	NM_010555	0.4	53
	<i>Rev</i>	GAGTCCAATTTACTCCAGGTCAG			
Il33	<i>Fw</i>	TCCAACCTCCAAGATTTCCCCG	NM_001164724.2	0.4	58
	<i>Rev</i>	CATGCAGTAGACATGGCAGAA			
Rpl13a	<i>Fw</i>	AGCCTACCAGAAAGTTTGCTTAC	NM_009438.5	0.4	60
	<i>Rev</i>	GCTTCTTCTCCGATAGTGCATC			

10.6.14 *Análisis de la cuantificación de citocinas*

Para el análisis se usó el software FCAP Array BD CellQuest™, el cual mostró la concentración de las citocinas en intensidad de captura por el láser, se obtuvo las gráficas de cuantificación por cada citocina y se compararon entre los grupos de estudio, aplicando la corrección de intensidad de fluorescencia.

10.7 *Diseño y plan de análisis de datos*

El análisis estadístico se realizó usando el programa SPSS statistics v29.0.1 (IBM Armonk, NY, USA). Se calcularon las medias y desviaciones estándar por grupo y fueron contrastados la prueba t de student para muestras independientes para determinar diferencias entre grupos. Para la evaluación clínica de la artritis se utilizó el análisis de medidas repetidas y la prueba de Bonferroni para comparar los puntajes, mientras que el análisis Kaplan-Meier y la prueba mantel-cox se emplearán para comparar las incidencias entre grupos. Para la evaluación histológica se realizará una prueba de ANOVA unidireccional y la prueba de Tukey HSD para el puntaje en infiltrado inflamatorio y erosión de condral entre grupos. Se considerarán diferencias significativas al obtener valores de $p \leq 0.05$.



11. ASPECTOS ÉTICOS Y DE BIOSEGURIDAD

El proyecto de Investigación se desarrolló en el Laboratorio de Investigación PABIOM de la Facultad de Medicina y Ciencias Biomédicas, bajo la aprobación del comité de ética e investigación, además de comité interno para el cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL) bajo el número CI-013-22 en donde los procedimientos, métodos y técnicas a ejecutar para el cumplimiento de los objetivos establecidos, atienden a las consideraciones éticas pertinentes estipuladas en las normas, reglamentos y/o manuales nacionales e internacionales para la ejecución de proyectos de investigación en animales:

- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio(55).
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1- 2002 Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
- GUIDE LABORATORY FOR THE CARE AND USE OF ANIMALS. Eighth Edition. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals Institute for Laboratory Animal Research Division on Earth and Life Studies. National Research Council of the National Academies(16).

En la NOM-062-ZOO-1999 se establece las especificaciones técnicas para el manejo y cuidado de los animales de laboratorio. Esta norma tiene como objetivo proteger la salud y el bienestar de los animales utilizados en la investigación científica y garantizar la calidad de los datos obtenidos en los estudios.

Entre los aspectos que se mencionan en la NOM-062-ZOO-1999 se encuentran:

- Las condiciones de las instalaciones donde se alojan los animales, que deben ser seguras, higiénicas y proporcionar el espacio necesario para que los animales se muevan y realicen sus comportamientos naturales.



- Las características de las jaulas o contenedores donde se alojan los animales, que deben estar diseñados para evitar el escape de los animales y permitir su adecuada ventilación y limpieza.
- Los requisitos de alimentación y agua, que deben ser adecuados para satisfacer las necesidades nutricionales y fisiológicas de los animales.
- Los procedimientos de manejo y cuidado de los animales, que deben ser realizados por personal capacitado y supervisado para minimizar el estrés y el dolor en los animales.
- Los requisitos para la documentación y registro de los procedimientos experimentales, así como para la disposición de los animales después de los experimentos.

En resumen, la NOM-062-ZOO-1999 establece las normas y estándares para el manejo y cuidado ético de los animales de laboratorio en México.(55)

Además, los proyectos desarrollados en este laboratorio atienden la reglamentación para la protección y salud ambiental: NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1- 2002 Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Específicamente, el manejo de los animales atiende las consideraciones y condiciones citadas a continuación las cuales propician un manejo adecuado de los mismos.

11.1 Condiciones ambientales

Los animales estuvieron bajo condiciones ambientales estables y habituales: temperatura de 22 ± 2 °C, humedad de 36 ± 1 %, ciclos de 12 h luz/oscuridad y aseo de jaula y cambio de aserrín al menos dos veces por semana.



11.2 Alimentación e hidratación

Los animales del grupo control tuvieron acceso libre a la alimentación e hidratación con agua purificada, el grupo AI, fue sometido, según se comenta en metodología, a dieta ad libitum cada en días alternados, el agua se proporcionó ad libitum. El contenido nutricional del alimento fue el estándar para animales de laboratorio: 23% proteína, 6.5% grasa, 1% calcio, 4% fibra, y 0.65 fósforo (Formulab Chow Rg. SAGARPA A-0207-050).

11.3 Vigilancia de animales.

Los animales fueron vigilados por el personal a lo largo de todo el periodo de la investigación, tanto durante la inducción de artritis, así como durante los periodos de ayuno.

11.4 Criterios para la eliminación temporal o total de un animal del estudio.

A lo largo del estudio el Médico Veterinario Zootecnista (MVZ) indicó si alguno presenta signos patológicos que indique el sufrimiento del animal y que amerite la eliminación temporal o total del animal de estudio.

Los cambios detectados en el comportamiento de un animal son los primeros signos de un problema de salud. Los síntomas de dolor, enfermedad o malestar incluyen disminución del apetito, pérdida de peso, disminución de la actividad espontánea, anillos de porfirina alrededor de los ojos, cambios en los hábitos intestinales o de la vejiga y la irritabilidad. Los signos de una enfermedad más grave incluyen disminución de la temperatura corporal, pulso débil o disminución de la respiración. El investigador está comprometido a notificar de inmediato al MVZ si alguno de estos cambios se presenta en los animales.

Respetando los principios éticos de la experimentación con animales(16), y basado en los estudios anteriores *Liu et al.*(56), *Brand et al.*(19) y *Tanner et al.*(57), en los



que los grupos de estudio se formaban por 8 ratones, se inició el protocolo con una población de 16 ratones en total, para no comprometer la factibilidad del mismo por la eliminación ya sea temporal o total de algún animal a lo largo del estudio.

11.5 Métodos de eutanasia

La totalidad de los animales fueron sacrificados con la intención de obtención de las biopsias correspondientes para el análisis histopatológico, se utilizó isoflurano para evitar el sufrimiento del animal, fuerpn colocados en la cámara hasta que se pierdan los signos vitales por completo, vigilado por los responsables del proyecto.

12.RESULTADOS

12.1 Efecto del AI sobre el peso de los ratones con AIC

Durante la evolución del AIC y el AI se realizó el peso de los ratones, donde no se encontró una diferencia significativa en la evolución del peso salvó en 2 ocasiones como se muestra en la Figura 3.

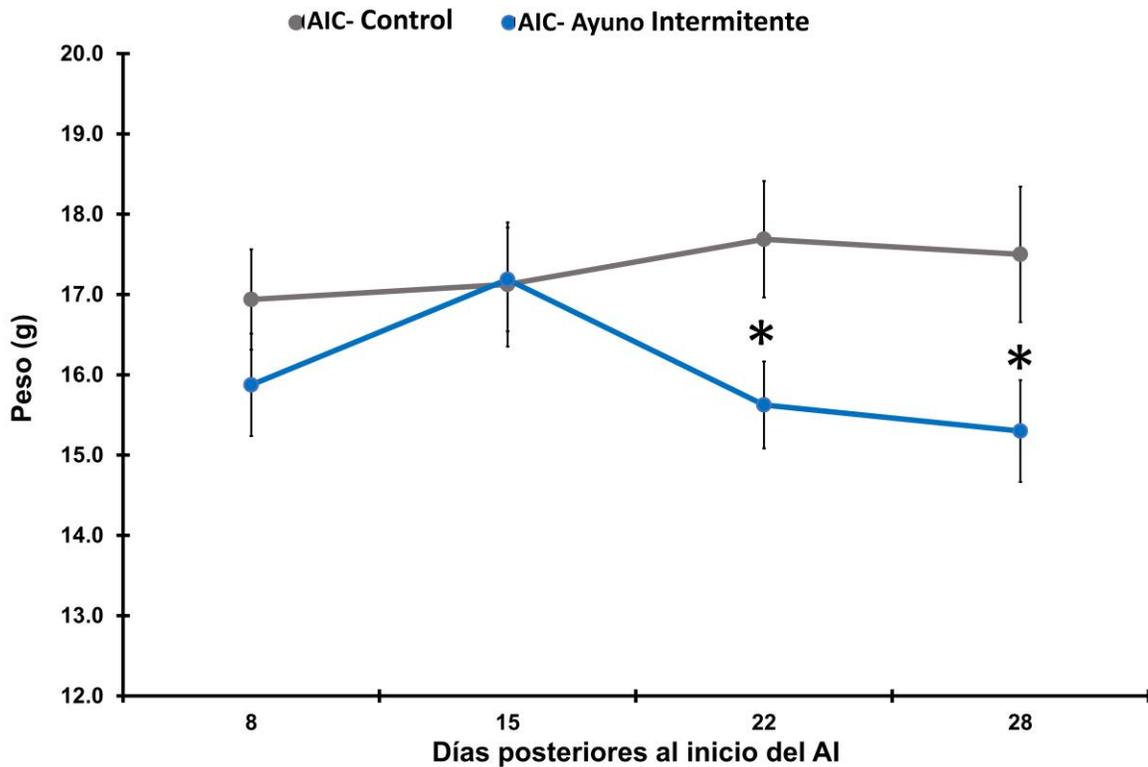


Figura 3. Evolución del peso de los sujetos de estudio a lo largo del experimento. *: $p \leq 0.05$.
AIC: Artritis inducida por colágeno.

12.2 Efecto del AI sobre los parámetros clínicos de la AIC

Durante el periodo de investigación, se pudo observar que AI afecta positivamente la inflamación clínicamente, la incidencia de la AIC se vio disminuida desde el día 1 ($p=0.019$) y se continuó disminuida significativamente hasta el término del experimento ($p=0.0005$) como se muestra en la Figura 4.

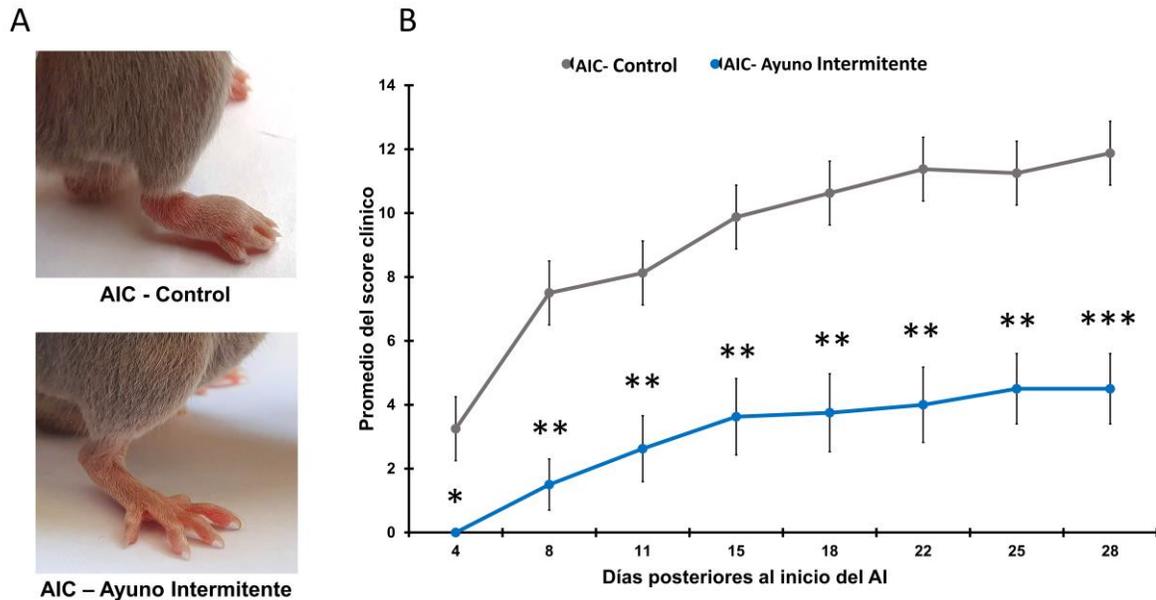


Figura 4. Evolución Clínica; (A) representación del promedio de la inflamación en las patas traseras de los sujetos de estudio al día 28, (B) Grafica de evolución clínica a través del tiempo de evolución, donde se observan diferencias significativas. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$. AIC: Artritis inducida por colágeno AI: Ayuno Intermitente.

12.3 Efecto del AI sobre los parámetros histológicos de la AIC

Posterior al tiempo de estudio y al sacrificio las muestras se procesaron y tiñeron con H&E para su evaluación final, fueron evaluadas por 3 evaluadores independientes. Dentro de la evaluación se encontró una diferencia significativa en casi todos los parámetros; se conoce que la historia natural de la enfermedad de la AIC genera un daño en las articulaciones, especialmente en las del tarso, MTF y las IF, para lo cual el AI tuvo un efecto positivo (Figura 5); el infiltrado inflamatorio ($p=0.03$), la hiperplasia sinovial ($p=0.04$), la erosión cartilaginosa ($p=0.02$), la erosión ósea ($p=0.02$), la entesitis ($p=0.01$), neoformación condral ($p=0.002$), aun así no se encontró diferencia significativa en la neoformación ósea ($p=0.09$), reducción del espacio articular ($p=0.42$) y la anquilosis ($p=0.48$).

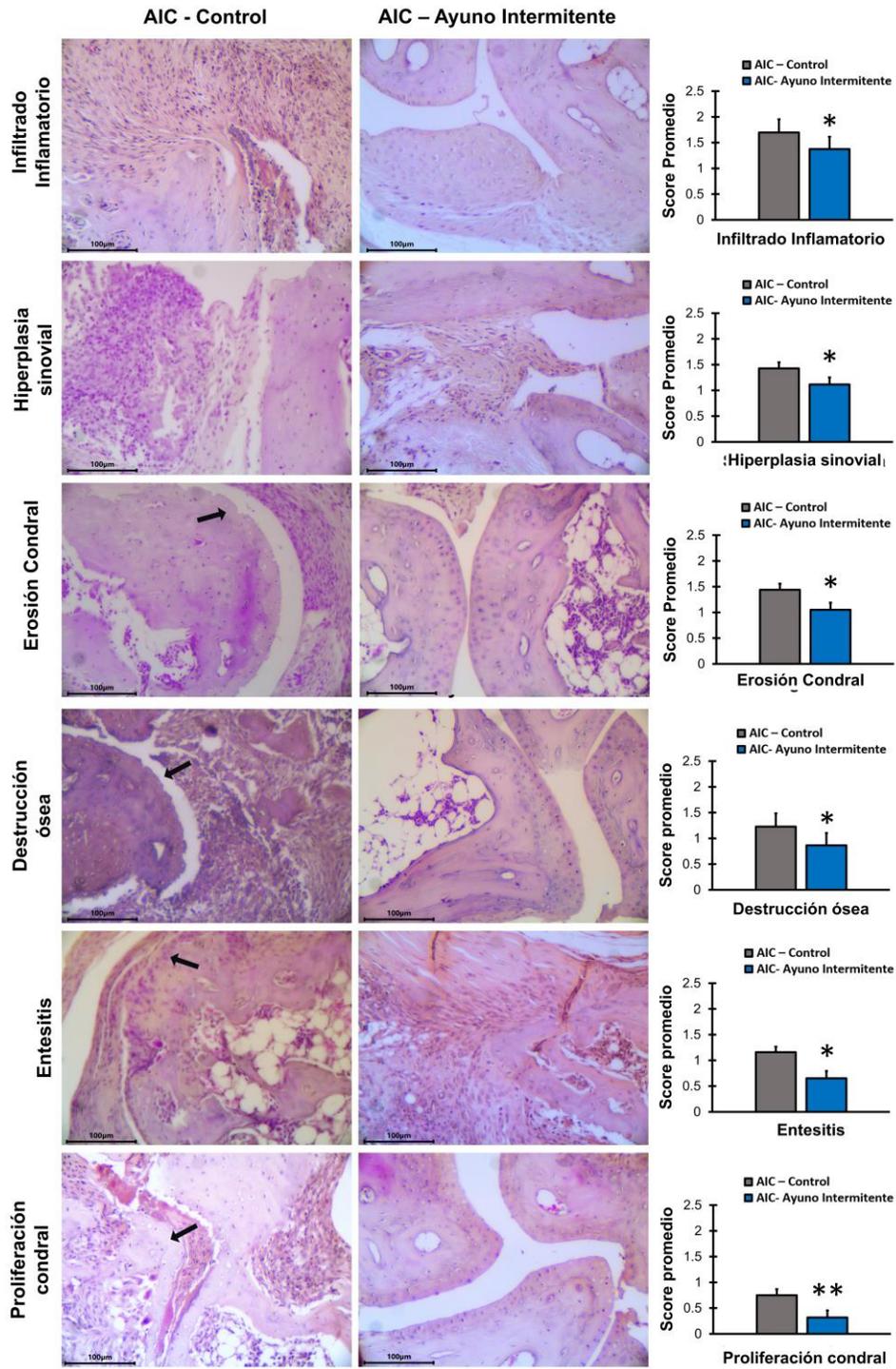


Figura 5. Evaluación histológica de los parámetros afectados. Comparación entre ambos grupos y su, se marcan con flechas los sitios más relevantes del parámetro evaluado. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$. AIC: Artritis inducida por colágeno AI: Ayuno Intermitente.



12.4 Análisis de expresión de proteínas mediante inmunohistoquímica

Para el análisis de IHQ se utilizó la IL-6 y el TNF- α , siendo de las citocinas proinflamatorias más afectadas en el proceso de AIC, se tomaron en cuenta varios cortes y con la herramienta de ImageJ se seleccionó únicamente la membrana sinovial para finalidad de análisis, se encontró que existe una diferencia en la expresión de TNF- α ($p=0.02$) aumentando la expresión en el grupo con AI, en la IL-6 no se encontró diferencia significativa entre los grupos ($p=0.17$) (Figura 6).

12.5 Extracción y cuantificación de ARN

La extracción se realizó mediante el proceso previamente mencionado, se cuantificó mediante el uso de fluorómetro de Invitrogen Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific) donde se encontraron las concentraciones marcadas en la Tabla 7.

Tabla 7. Cuantificación de ARN y separación de las muestras

Tubo	Muestra	ng/ μ l	Integridad	Puntaje	Pool
1	1.1C	1120	98	0	1
2	1.2C	2172	73	0	1
3	1.4C	1628	82	0	2
4	2.1C	1468	80	4	1
5	2.4C	2670	99	4	1
6	3.1C	1868	100	4	2
7	3.3C	1020	50	0	2
8	3.4C	2538	100	4	2
9	1.1S	1160	98	0	1
10	1.2S	1524	92	4	1
11	1.3S	622	100	4	1
12	2.2S	1020	87	4	1
13	2.3S	3180	57	4	2
14	2.4S	2160	96	4	2
15	3.1S	1908	62	4	2
16	3.3S	2562	19	4	2

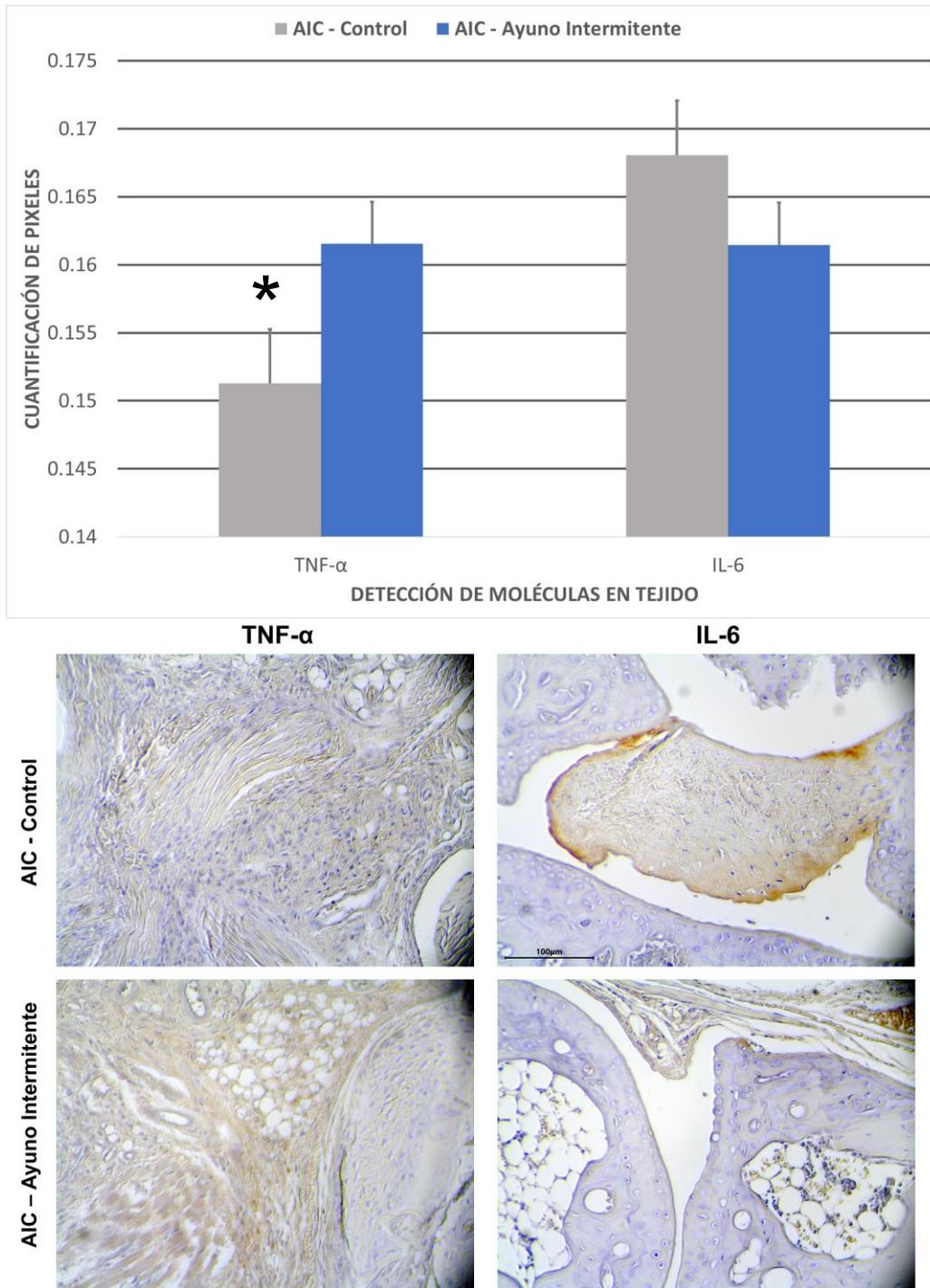


Figura 6. Análisis de expresión de marcadores proinflamatorios en tejido. Se encuentra la cuantificación de expresión de los marcadores mediante el uso de IHQ, para el análisis se utilizó la cuantificación selectiva de píxeles únicamente tomando en cuenta la expresión en membrana sinovial. *: $p \leq 0.05$. AIC: Artritis inducida por colágeno AI: Ayuno Intermitente.

12.6 Regulación del perfil transcriptómico inflamatorio articular

El análisis primario de las muestras se realizó en el programa Partek GeomeSuite, en el cual se realizó el análisis de componentes principales (Figura 8), el cual nos confirmó que la diferencia general entre la expresión génica es visible.

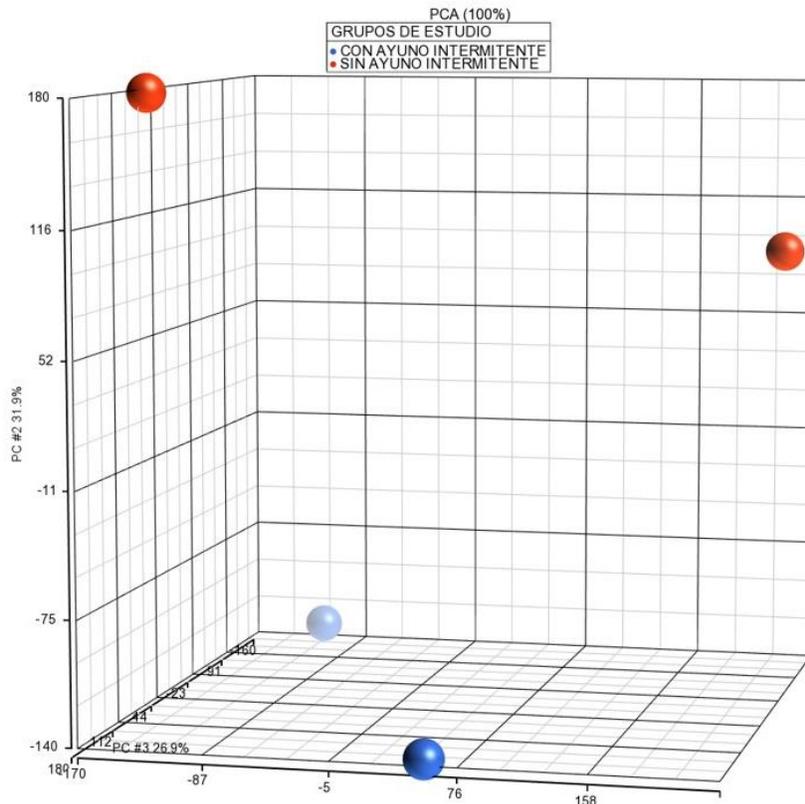


Figura 8. Análisis de componentes principales. Análisis de la diferencia entre la expresión génica entre grupos.

Se obtuvo el perfil de expresión génica de ambos grupos para conocer mejor las funciones biológicas modificadas por la AI. El análisis del conjunto de datos original normalizado de microarrays reveló un total de 364 genes sobreexpresados y 543 desregulados ($\log_2FC > 1,5$ o $< -1,5$, p ajustada $< 0,01$) (Figura 9).

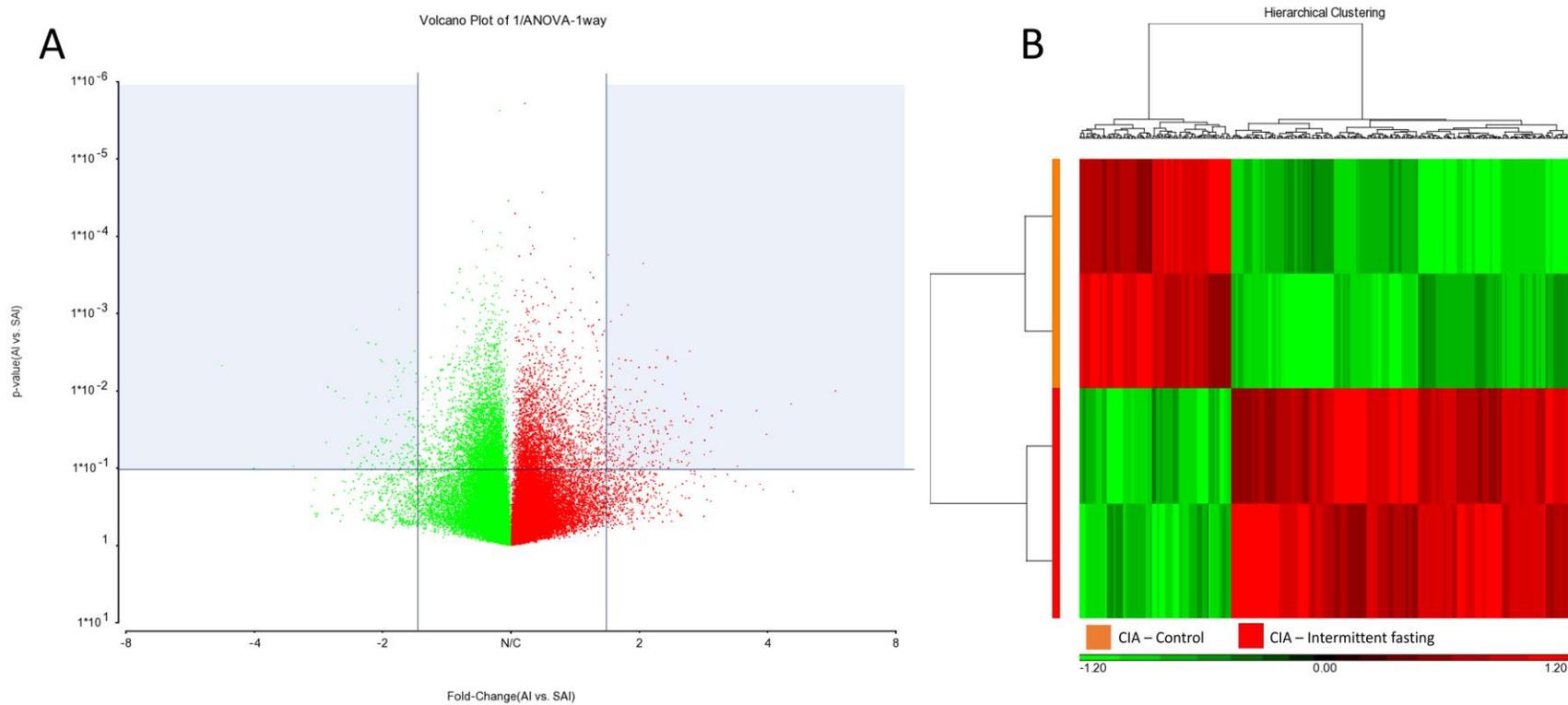


Figura 9. Gráfica de volcán. (A) Se muestra la cantidad de genes involucrados en el análisis, tomando en cuenta una $p \leq 0.01$ y un FoldChange ≤ -1.5 o ≥ 1.5 , (B) Mapa de calor donde se muestra la agrupación jerárquica; las áreas verdes y rojas muestran los genes sub y sobreexpresados, respectivamente.



El microarreglo se validó mediante RT-qPCR utilizando cinco DEG con la dirección y magnitud correspondientes (Figura 10).

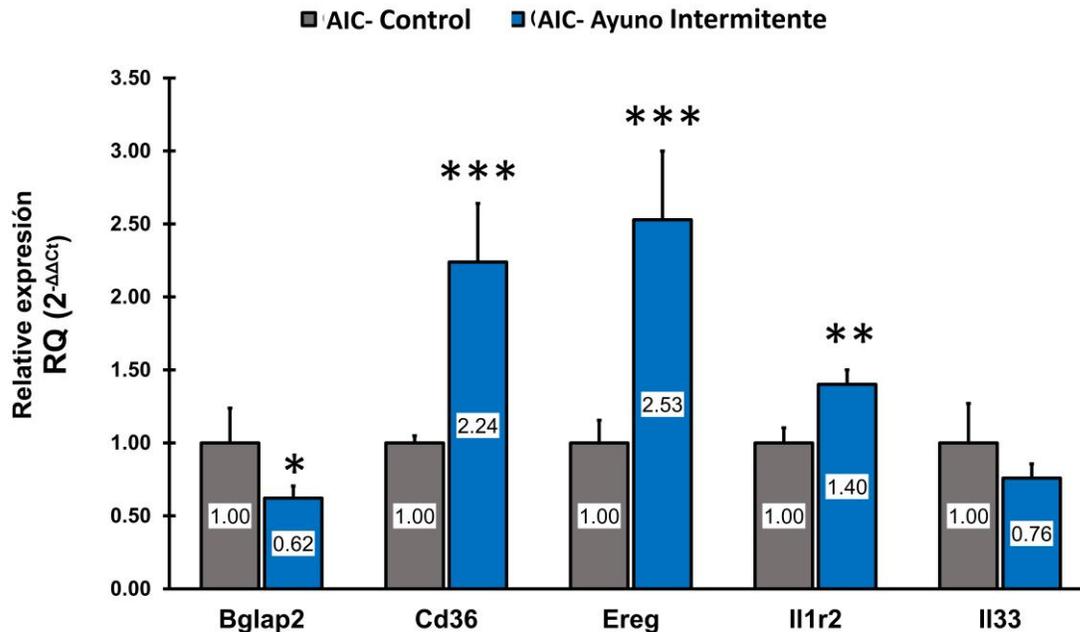


Figura 10. Validación de microarreglo con RT-qPCR. Genes más destacados en la expresión génica, la determinación del $\Delta\Delta CT$ se usó para cuantificación relativa, se usó la t de student para determinar diferencias entre grupos. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$. AIC: Artritis inducida por colágeno AI: Ayuno Intermitente, BGLAP2: proteína ósea gamma-carboxiglutamato 2, IL-1R2: receptor de interleucina1 R2, IL33: Interleucina 33, CD36: clúster de diferenciación 36 y Ereg: epiregulina.

Los cambios más significativos en la sobreexpresión génica se produjeron en Ereg (\log_2FC 5,57) y Pdk4 (\log_2FC 4,87); mientras tanto, los altos niveles de subexpresión correspondieron al ARN no codificante (\log_2FC -5,16 a -4,16). Además, nueve genes de la familia de las Proteínas Urinarias Mayores (MUP) (Mup 1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19) también estaban altamente subexpresados (\log_2FC -4,08 a -3,68). Los genes se regulaban a la baja, mientras que los reguladores transcripcionales se sobreexpresaban. Las vías con



sobrerrepresentación estaban relacionadas con la señalización de células B y T, la osteoartritis (OA) y la activación alternativa de macrófagos.

La relevancia biológica de los AI en nuestro modelo se analizó utilizando IPA para la agrupación de anotaciones funcionales. Los DEG se clasificaron según su función molecular y celular. Los genes que alcanzaron el umbral de p-valores $<0,01$ se asociaron con funciones biológicas o enfermedades en el Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Se utilizó la prueba exacta de Fischer para calcular el valor de p a fin de determinar la probabilidad de que cada función biológica/enfermedad asignada al conjunto de datos no se deba únicamente al azar. La Figura 11 muestra las enfermedades y funciones biológicas más significativas. Las principales funciones moleculares y celulares asociadas a este conjunto de genes incluían el lupus eritematoso sistémico (LES) en la vía de señalización de células B, con 17 moléculas implicadas ($p = 0,000108$).

Las vías con z-score positivo fueron la biosíntesis de retinol ($p = 0,00086$, z-score: 2,0), la vía de señalización de activación alternativa de macrófagos ($p = 0,00139$, z-score: 1,89) y la degradación de nicotina II ($p = 0,00249$, z-score: 2,0). Las vías con z-score negativo estaban relacionadas con el proceso inflamatorio, incluida la vía de señalización del LES en células B ($p = 0,000108$, z-score: -0,447), y la vía de la OA ($p = 0,0263$, z-score: -0,447) (Figura 11, Tabla 8).

Los genes desregulados también se asociaron con procesos biológicos clasificados como sin patrón de actividad disponible por el IPA, incluyendo el desarrollo de células B, la señalización del LES, la comunicación entre células inmunitarias innatas y adaptativas, y la señalización alterada de células T y B en la AR, entre otros. En el caso de la señalización alterada de células T y B en la AR, se asociaron 17 moléculas subexpresadas ($p=0,0000386$), incluyendo inmunoglobulinas (Ig), IL, CD y receptores de células T (Tabla 8). El algoritmo de efectos reguladores IPA conecta los reguladores ascendentes, las moléculas del conjunto de datos y las funciones o enfermedades descendentes. Este algoritmo identificó cuatro posibles



reguladores centrales (Figura 11); la puntuación más alta para reguladores ascendentes fue la proteína alfa de unión a potenciadores CCAAT (CEBPA), la proteína de caja de horquilla (FOXO)1, el factor inducible por hipoxia (HIF)1A, los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR)G y PPARA (Figura 12).

Tabla 8. Vías de señalización afectadas por el AI y los genes relacionados.

Efecto	Vía	Genes (Log2FC)
Z-score positivo	Biosíntesis de Retinol	Ces4a (1.850), Lpl (1.520), Pnpla2 (1.900), Rdh11 (1.550)
	Vía de activación alterna de macrófagos	Cd36 (1.530), Il33 (-1.620), Il1r2 (2.070), Irs2 (1.690), Lpl (1.520), Retnla (-1.920), Tsc22d3 (2.230)
	Degradación de Nicotina II	Adh7 (2.110), Cyp2b10 (1.830), Fmo2 (2.920) Inmt (1.790)
Z-score negativo	Lupus Eritematoso Sistémico en la vía de señalización de células B	Cd72 (-1.510), Cd79a (-1.840), Ifna13 (-1.550), Ighv5-4 (-2.100), Ighv5-6 (-1.760), Ighv5-15 (-2.100), Ighv8-9 (-1.970), Ighv8-13 (-1.840), Igkv12-89 (-1.900), Igkv13-84 (-17-127 (-1.770), Igkv6-23 (-1.590), Igkv7-33 (-1.840), Igkv8-16 (-1.500), Igkv9-123 (-1.620), Il33 (-1.620), Rasd1 (1.510)
	Vía de osteoartritis	Bglap2 (-1.850), Casq1 (-1.710), Ddit4 (3.150), Il1r2 (2.070), Itgb6 (-1.700), Sdc4 (1.720)
Patrón de actividad no disponible	Señalización alterada de células B y T en AR	Cd79a (-1.840), Ighv5-4 (-2.100), Ighv5-6 (-1.760), Ighv5-15 (-2.100), Ighv8-9 (-1.970), Ighv8-13 (-1.840), Igkv12-89 (-1.900), Igkv13-84 (-17-127 (-1.770), Igkv6-23 (-1.590), Igkv7-33 (-1.840), Igkv8-16 (-1.500), Igkv9-123 (-1.620), IL33 (-1.620), Traj29 (-1.600), Trav11d (-1.500), Trav7d-2 (-1.500)
	Señalización de la Fosfolipasa C	Cd79a (-1.840), Ighv5-4 (-2.100), Ighv5-15 (-2.100), Ighv8-9 (-1.970), Ighv8-13 (-1.840), Igkv12-89 (-1.900), Igkv13-84 (-17-127 (-1.770), Igkv6-23 (-1.590), Igkv7-33 (-1.840), Igkv8-16 (-1.500), Igkv9-123 (-1.620), Itgb6 (-1.700), Plcd4 (-1.580), Rasd1 (1.510), Rhou (1.750), Traj29 (-1.600), Trav11d (-1.500), Trav7d-2 (-1.500)



Dado que el análisis se realizó a través de la respuesta inflamatoria, algunas moléculas fueron compartidas entre las vías canónicas inflamatoria y de remodelación ósea, incluyendo BGLAP (\log_2FC -1,85, $\Delta\Delta CT$ 0,62), CD36 (\log_2FC 1,53, $\Delta\Delta CT$ 2,24), IL1R2 (\log_2FC 2,07, $\Delta\Delta CT$ 1,40), IL33 (\log_2FC -1,62, $\Delta\Delta CT$ 0,76), y EREG (\log_2FC 5,57, $\Delta\Delta CT$ 5,53); que estaban relacionados con la activación de células B y T, activación alternativa de macrófagos y OA, y por otro lado con vías metabólicas. Como era de esperar, la respuesta inflamatoria disminuyó y, en consecuencia, también el daño óseo. La figura 13 muestra las predicciones de las consecuencias del AI en la vía de señalización de la OA, que comparte varios procesos patogénicos con la CIA. Como muestran las formas y líneas azules, el AI conduce a la inhibición de moléculas de señalización, receptores, factores de transcripción y moléculas efectoras estrechamente relacionadas con la inflamación, el catabolismo del cartílago, la osificación y la apoptosis en la artritis, incluyendo integrinas, caspasas, RUNX2, CEBPB, COL10A, VEGF, ALP, BGLAP, entre otras. En la figura 14 se muestra el efecto previsto de la AI sobre el LES en la señalización de las células B.

Los mediadores inflamatorios disminuyeron en las células dendríticas plasmocitoides (pDCs): STING1, citoquinas proinflamatorias, IFN tipo 1, e IFNA, mientras que en las células B del LES: Ig, CD79A y CD72. Según los valores \log_2FC , las cadenas de la familia Ig, incluidas Ighv5-4 e Ighv5-15, fueron las que presentaron una inhibición más representativa. Además, se predijo la inhibición de otras moléculas de señalización y factores de transcripción por el AI, incluyendo TBK1, IRF3, 5 y 7, NFkB e IFNB en los pDC, y TLR7 y 9, JAK1, TYR2, STAT1, 2, 3 y 9, entre muchos otros en las células B del LES. La visión global del efecto del AI sobre esta vía de señalización predijo una disminución de la formación, proliferación y supervivencia de las células B en nuestro modelo de inflamación.

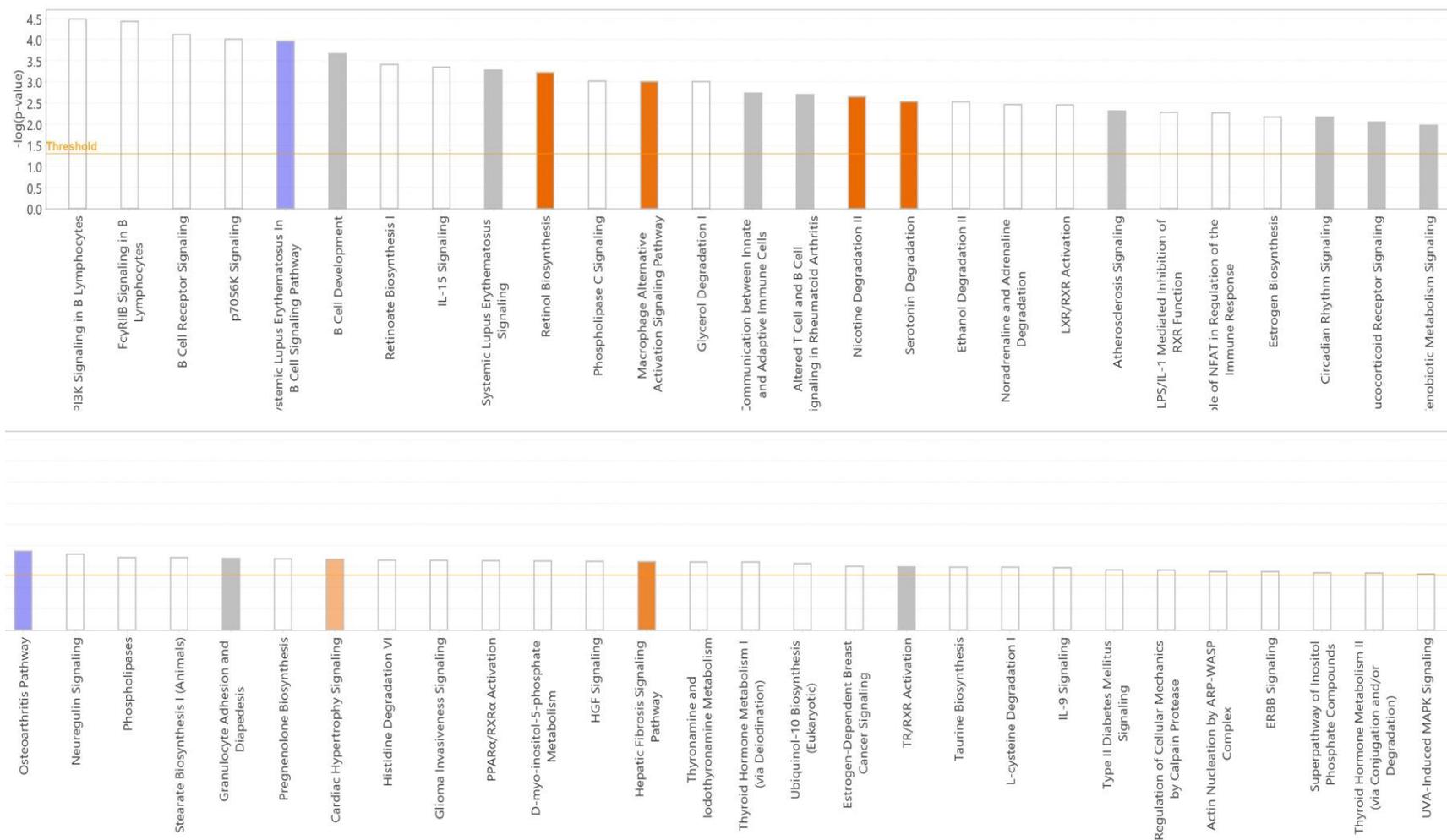


Figura 11. Vías afectadas por el AI. En azul se muestran las vías silenciadas, en naranja, las que se predicen activadas, en blanco las neutras y en gris, las que el IPA no predijo actividad por falta de información.

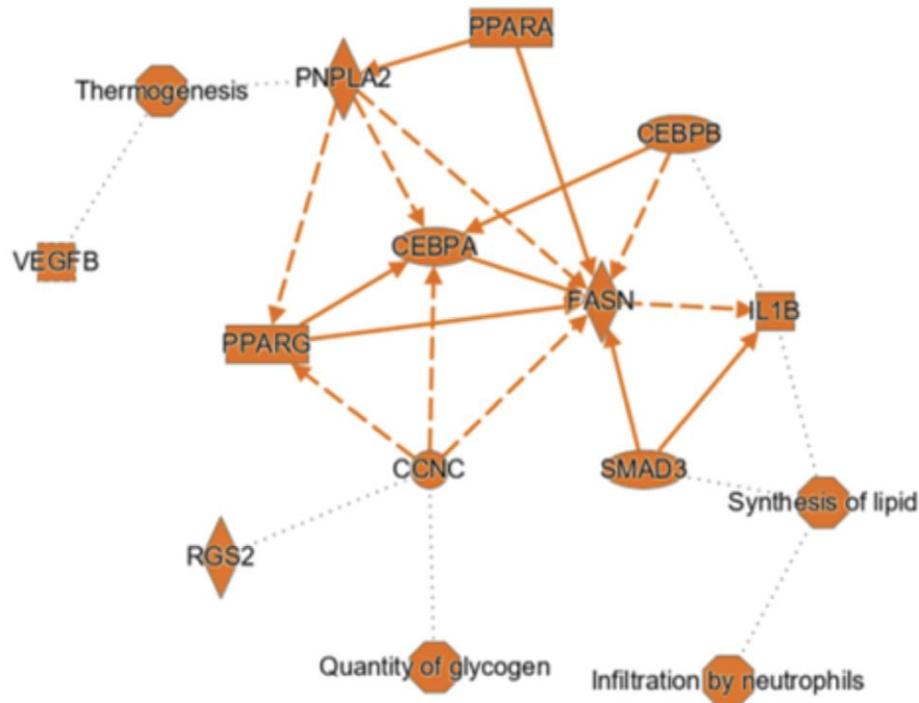


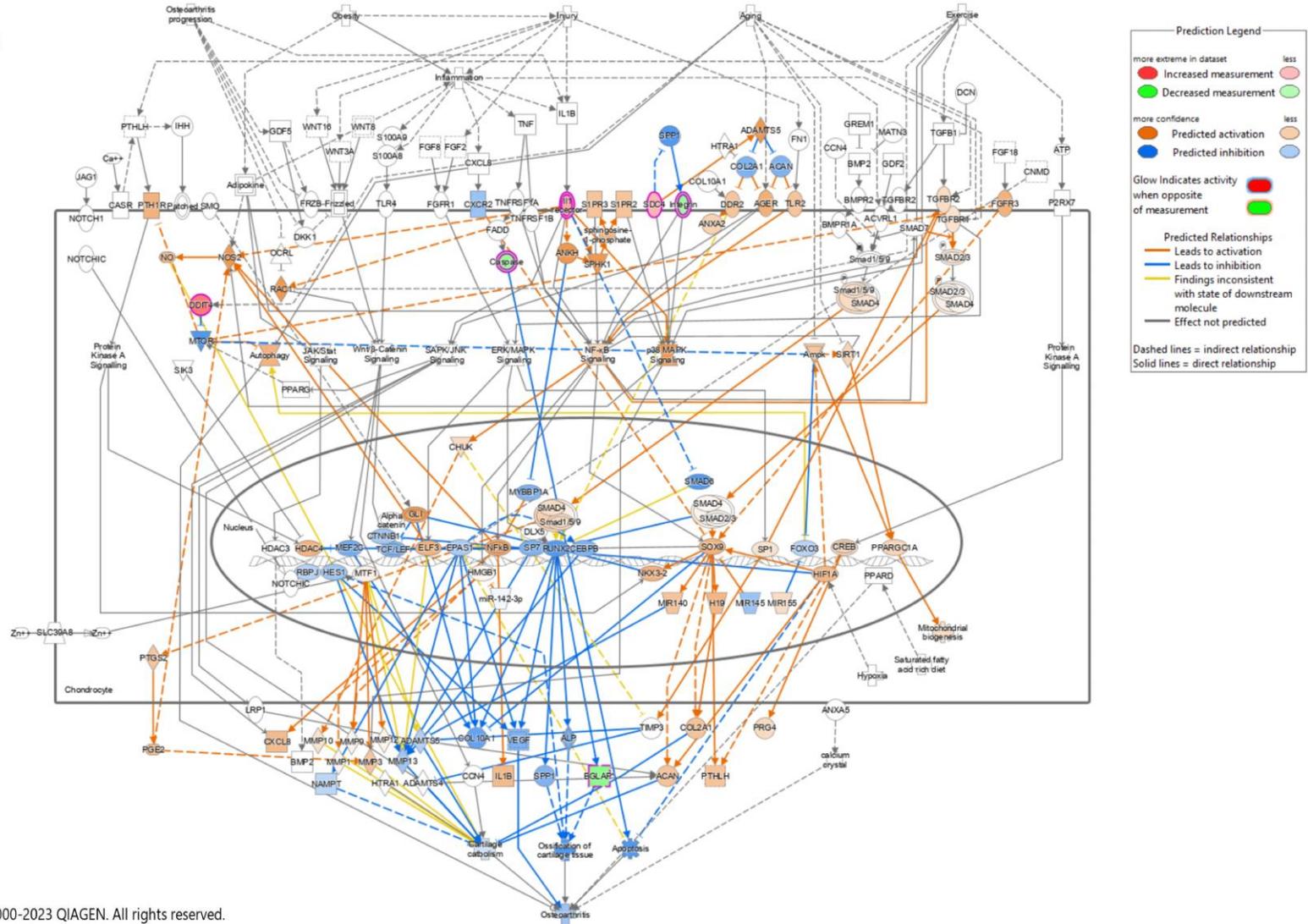
Figura 12. Principales mediadores y acciones realizadas. Línea sólida: Interacción directa activación, Línea naranja punteada: Interacción directa silenciamiento, Línea punteada: Interacción indirecta. VEGFB: Factor de crecimiento vascular endotelial B, PNPLA2: Dominio de fosfolipasa similar a patatin 2, CEBPA: Proteína de unión al potenciador CCAAT alfa, PPARG: Receptor activador del proliferador del peroxisoma gamma, PPARA: Receptor activador del proliferador del peroxisoma alfa, FASN: Ácido graso sintasa, IL1B: Interleucina 1B, CCNC: Mediador conservado de la subunidad de ciclina C, SMAD3: Proteína similar a *Drosophila melanogaster* 3, RGS2: Regulador de la señalización de la proteína G 2.

Las predicciones IPA para la señalización alterada de células T y células B en la AR se clasificaron como sin patrón de actividad disponible; sin embargo, como se muestra en la Figura 13, moléculas críticas en la patogénesis de la AR, incluyendo IL1, BCR, y TCR se redujeron, y se encontró la predicción de la inhibición de la activación de los osteoclastos y la apoptosis. Los DEG estaban asociados a procesos metabólicos e inflamatorios (Figura 15). El transporte molecular, la bioquímica de moléculas pequeñas, el metabolismo de los lípidos, el metabolismo

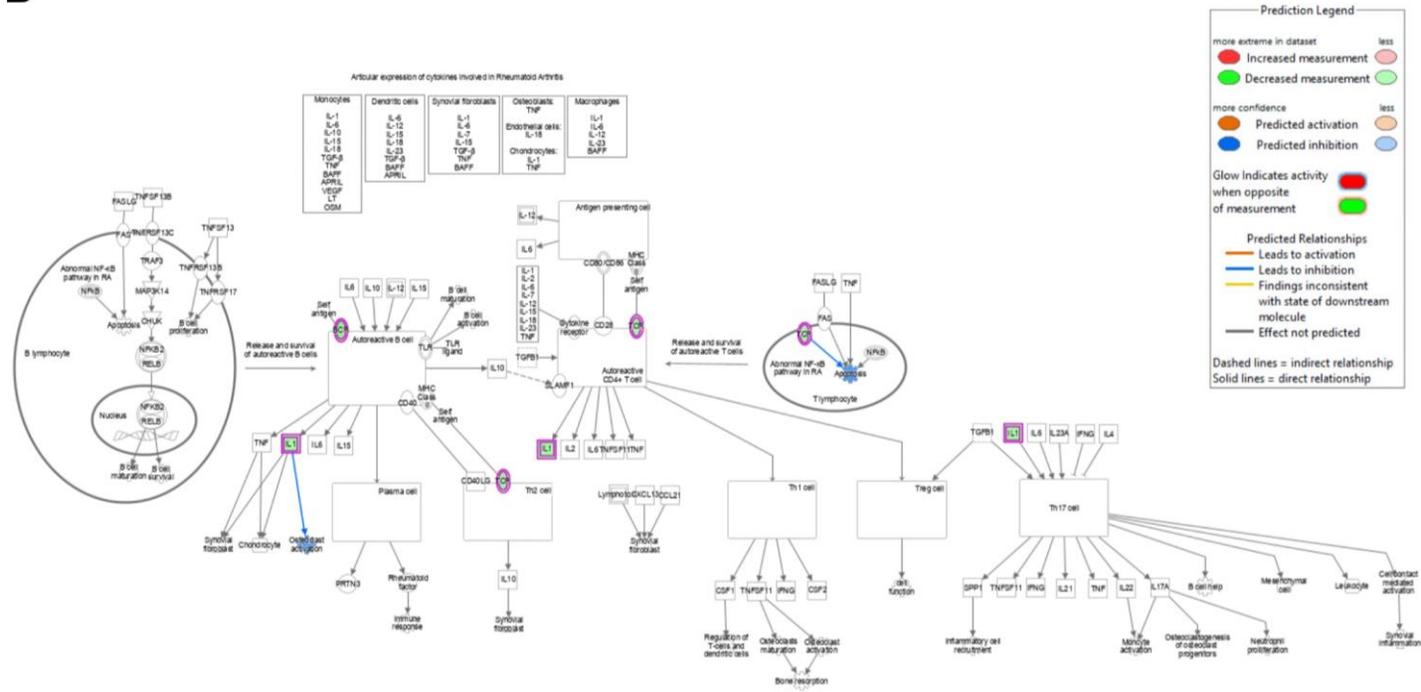


de los hidratos de carbono, la morfología de los tejidos y el desarrollo celular tendían a aumentar debido al efecto de la AI. Por el contrario, el ayuno disminuyó la señalización célula a célula, la síntesis de proteínas, las lesiones y anomalías del organismo, la respuesta inflamatoria, las enfermedades metabólicas, el cáncer y los trastornos endocrinos, reproductivos, gastrointestinales, esqueléticos y del sistema muscular. En la respuesta inflamatoria (Figura 15B), se observó una disminución de la enfermedad artrítica inducida experimentalmente.

A



B



© 2000-2023 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 13. Desregulación de la osteoartritis y artritis reumatoide en el modelo de artritis inducida por colágeno. Los genes expresados diferencialmente se clasificaron según su función molecular y celular. Los genes que alcanzaron el umbral de $p < 0,01$ se asociaron con procesos biológicos o enfermedades en el conocimiento de QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Para calcular el valor p se utilizó la prueba exacta de Fischer para determinar la probabilidad de que cada función biológica/enfermedad asignada al conjunto de datos no se deba únicamente al azar. Las relaciones directas e indirectas y la acción predicha en el receptor, la molécula, la proteína y el factor de transcripción desencadenados por el FI en el condrocito ($p = 2,63E-02$, z-score: $-0,447$) y en la articulación ($p = 3,86E-05$) en la Osteoartritis (A) y en la artritis reumatoide (B), mostradas respectivamente.

Figura 14. Desregulación de la vía de activación de las células B del lupus eritematoso sistémico por el ayuno intermitente en el modelo de artritis inducida por colágeno. Los genes expresados diferencialmente se clasificaron según su función molecular y celular. Los genes que alcanzaron el umbral de p-valores <0,01 se asociaron con procesos biológicos o enfermedades en el conocimiento de QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Para calcular el valor p se utilizó la prueba exacta de Fischer para determinar la probabilidad de que cada función biológica/enfermedad asignada al conjunto de datos no se deba únicamente al azar. Se muestran las relaciones directas e indirectas y la acción prevista en el receptor, la molécula, la proteína y el factor de transcripción desencadenados por el FI en las células dendríticas plasmocitoides (pDC) y las células B del LES (p = 0,000108, z-score: -0,447).

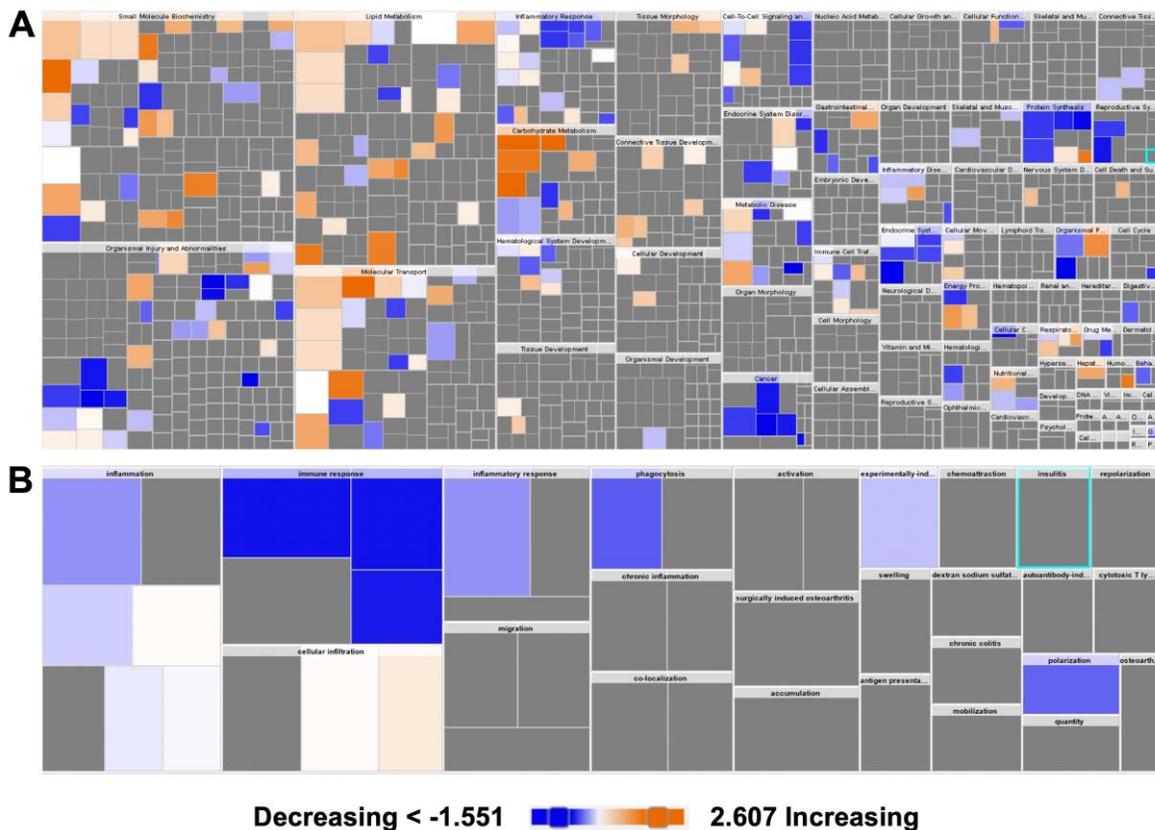


Figura 15. Enfermedades y biofunciones modificadas por el ayuno intermitente en el modelo de artritis inducida por colágeno. (A) Mapa de calor de la mayor biofunción modificada por el AI. (B) Amplificación del mapa de calor para un análisis más profundo de los cambios en la respuesta inflamatoria por el AI.



13. DISCUSIÓN

El tipo de dieta puede influir en la inflamación de los pacientes con AR (3,58) siendo la AI una de las estrategias con efectos positivos al reducir los síntomas de la enfermedad (38,59). Sin embargo, se desconocen los mecanismos celulares que sustentan la mejoría clínica. El presente estudio demuestra el efecto antiinflamatorio de AI en un modelo murino de AIC a nivel transcriptómico, histológico y clínico. La AI retrasa la aparición clínica de la artritis y disminuye su gravedad en las patas delanteras y traseras; además, reduce la inflamación y la remodelación tisular.

En este estudio, se encontró que la expresión de citocinas proinflamatorias en el tejido no se vio afectada, e inclusive la expresión de TNF- α se vio incrementada, sin embargo, la marca transcriptómica muestra que en general los mediadores de la producción y actividad de TNF se encuentran subregulados. Así mismo la marca de citocinas se vio regulada por el ayuno, donde se encontraron cambios en la expresión a lo largo del tiempo de la IL-10, la cual es una citocina antiinflamatoria, además de una disminución de IL-12p70 la cual se ve relacionada con la secreción de mediadores por macrófagos y células presentadoras de antígenos, así como la activación de las células Th₁ en procesos proinflamatorios, misma citocina que es blanco en el tratamiento de enfermedades autoinmunes(60,61).

El AI induce la subexpresión de genes y vías de señalización estrechamente relacionados con los procesos inmunitarios e inflamatorios, incluidos los de la AR. Aunque los efectos sobre la inflamación fueron el objetivo de nuestro estudio, como era de esperar la AI modificó procesos celulares relacionados con el metabolismo de lípidos y carbohidratos, así como otros que incluían el metabolismo del retinol, la serotonina y la nicotina.

El mecanismo molecular de los efectos antiinflamatorios del AI se ha demostrado previamente en modelos animales de inflamación no articular (50,62). Este es el primer estudio que demuestra el efecto antiinflamatorio del transcriptoma de la AI



en un modelo de AR. Según nuestros resultados, la AI indujo la regulación a la baja de genes relacionados con la AR, siendo Ereg el más regulado a la baja. Ereg tiene un papel claro en la patogénesis de diferentes enfermedades inflamatorias, incluida la AR (63) en la que afecta a la apoptosis de los sinoviocitos fibroblásticos (FLS), la proliferación, la producción de citocinas, la inflamación inducida por citocinas, la señalización intracelular, la angiogénesis, la destrucción ósea y la condrogénesis, a través del ligando Fas (64).

Nuestro análisis del transcriptoma mostró que la mayor sobreexpresión correspondía a los ARN no codificantes, lo que indica una amplia influencia de los reguladores transcripcionales en el efecto antiinflamatorio de la AI. Los genes más sobreexpresados fueron los MUPs, lipocalinas implicadas en la comunicación feromonal, cuya producción representa una importante inversión metabólica para *Mus musculus*. Además de su papel en la comunicación química, las MUPs también parecen ejercer funciones metabólicas y aumentar el gasto energético, la temperatura corporal central, la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina en ratones (65). Se ha demostrado que la cantidad de ingesta dietética puede afectar a la expresión de MUPs y modular su secreción (66) lo que concuerda con nuestros resultados. Varios genes subexpresados en nuestro análisis estaban asociados a las vías de señalización de la OA y el LES, estrechamente relacionadas con la AR. Los algoritmos IPA predijeron la participación de otros actores en estas vías de señalización que condujeron a la disminución de la inflamación y la destrucción articular debida al AI. La OA y la AR comparten la destrucción osteocondral basada en la inflamación, en la que existe una estrecha interacción entre los tejidos óseos y las células inmunitarias a través de las citocinas inflamatorias (67). En nuestro estudio, los genes de la vía de señalización de la OA compartidos con la patogénesis de la CIA y la AR fueron modificados por la AI, incluyendo Bglap (68) y syndecan-4 (Sdc4) (69).

Por otro lado, la etiología y la patogenia de la AR y el LES están interconectadas de varias maneras; sus firmas génicas están implicadas en las respuestas inmunitarias



innatas y adaptativas, el desarrollo óseo y el crecimiento (70). Nuestros resultados muestran la subexpresión de algunos genes compartidos entre el LES y la AR, incluyendo Cd72a, Cd79, Ifna, y varios genes de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina (Ighv) y del cluster variable de la inmunoglobulina kappa (Igkv). Curiosamente, la IL-33, un mediador en la patogénesis del LES, también fue subexpresada por AI en la CIA. Recientemente se han descrito las posibles funciones mecánicas de la IL-33 en la AR al promover reacciones bioquímicas en macrófagos, mastocitos y granulocitos. La IL-33 se correlaciona con muchos biomarcadores de la enfermedad, como el factor reumatoide, los anticuerpos antipolipéptido citrulinado cíclico, la vimentina citrulinada antimutante y la IL-18, lo que puede suponer un gran avance en el tratamiento de la AR (71). La IL-33 se ve influida por el ayuno en la diabetes y la obesidad (72).

El efecto antiinflamatorio de la AI en la CIA se visualizó con mayor claridad en los mapas de calor de enfermedades y biofunciones, en los que también se observó el aumento de la expresión del metabolismo de lípidos y carbohidratos, el transporte molecular y la bioquímica de moléculas pequeñas. Además de la disminución de la respuesta inflamatoria, el mapa de calor mostró que las enfermedades metabólicas, el cáncer y los procesos de los sistemas endocrino, gastrointestinal y reproductor se redujeron gracias a la AI. Estos resultados concuerdan con pruebas muy recientes que sugieren que la MI es una intervención dietética prometedora para las enfermedades autoinmunes (73) crónicas (74) gastrointestinal (75) y cardiovasculares (76) así como diabetes de tipo 1 y 2 (77), envejecimiento (78) y el cáncer (79).

Nuestro análisis bioinformático en IPA identificó cuatro posibles reguladores centrales en los efectos del AI sobre el CIA. Los reguladores CEBPA, FOXO1, HIF1A, PPARG y PPARA obtuvieron las puntuaciones más altas. La evidencia actual ha relacionado estos reguladores con la patogénesis de la AR, y se ha demostrado que muchos tratamientos experimentales ejercen su efecto antiinflamatorio a través de ellos. CEBP es un factor de transcripción que se expresa



durante la fase tardía de las respuestas inflamatorias, cuando la inflamación se desvanece. El tratamiento con MTL-CEBPA, un pequeño ARN activador dirigido a la regulación de C/EBP α , en un modelo de ratón humanizado desafiado por LPS regula al alza el ARNm de C/EBP α , aumenta los neutrófilos y atenúa la producción de varias citocinas proinflamatorias críticas, como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IFN- γ (80). Además, el tratamiento con aceite de cáñamo induce la apoptosis mediada por especies reactivas del oxígeno y la proteína homóloga CEBP en la AR-FLS humana (81). El factor de transcripción FOXO1 influye en múltiples procesos celulares, como la inflamación, el metabolismo y la transducción de señales. En consonancia con las predicciones de nuestro análisis transcriptómico, estudios previos han demostrado que FOXO1 es un factor implicado en el tratamiento experimental de la AR. El tratamiento con berberina inhibe la proliferación y adhesión de RA-FLS mediante la regulación de las vías de señalización RAS/MAPK/FOXO/HIF-1 (82). Del mismo modo, el tratamiento con Eriodictyol inhibe la supervivencia y las respuestas inflamatorias en la AR-FLS a través de la señalización AKT/FOXO1 (83). Curiosamente, el tratamiento con nanopartículas liposomales de metotrexato induce la apoptosis a través de NF- κ B y FOXO1 in vitro (84). HIF-1 α es un sensor metabólico primario que se expresa en células inmunitarias y no inmunitarias, incluido el FLS. Se conocen las funciones inmunopatológicas de HIF-1 α en las enfermedades autoinmunes, incluida la AR (85) y, en la actualidad, la inhibición selectiva de la vía GRK2/HIF-1 α es una estrategia eficaz para aliviar la hipoxia sinovial y la inflamación (86).

Los PPAR son receptores nucleares que funcionan como factores de transcripción activados por ligandos estrechamente relacionados con el metabolismo de los lípidos, que se han relacionado con trastornos metabólicos y son dianas farmacéuticas atractivas. Los PPAR inhiben la proliferación y activación de RA-FLS y alivian la respuesta inflamatoria en FLS inducida por TNF- α mediante la unión a p53 (87). Además, el efecto antiinflamatorio a través de PPAR- γ se ha demostrado mediante tratamientos complementarios en el modelo de CIA, incluido el consumo



de manteca de cerdo rica en ácidos grasos saturados (88) y Morin (89). Los estudios transcriptómicos sobre el ayuno afirman su profundo impacto en diversos procesos reguladores y su potencial como terapia coadyuvante. Harkvoort et al. meticulosamente las consecuencias fisiológicas del ayuno prolongado en diversos órganos de ratones normales. Como describen en su artículo, la adaptación al ayuno es específica de cada órgano (hígado, cerebro, riñón, músculo e intestino) y existen intrincadas redes de comunicación para sincronizar la respuesta interorgánica al ayuno. En consonancia con nuestro análisis, revelaron que PPAR α y FOXO1 están notablemente regulados al alza en respuesta al ayuno, sirviendo como puntos de convergencia fundamentales para las vías activadas en diferentes órganos.

Numerosos estudios corroboran la influencia del AI en un amplio espectro de procesos celulares. La AI demuestra la notable capacidad de revertir la senescencia en los folículos ováricos envejecidos facilitando la restauración de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y la sirtuina 1 (90). En el hígado, instiga una redefinición de numerosos patrones de activación que van más allá del metabolismo nutricional para abarcar alteraciones en la dinámica mitocondrial y aspectos de la inmunorregulación (91). En los leucocitos CD45+, la AI favorece las vías autofágicas (92) y delinearon regula la apoptosis (93) y en los linfocitos CD4+, atenúa su respuesta inhibiendo mTOR a través de la mediación de FOXO4 (94). Por consiguiente, se considera que la AI posee un potencial considerable para influir positivamente en las enfermedades inflamatorias orquestando una regulación profunda del metabolismo celular.



14. CONCLUSIÓN

Los resultados generales obtenidos de nuestro análisis transcriptómico sugieren el potencial antiinflamatorio de la AI como estrategia potencial para mejorar las respuestas terapéuticas en pacientes con AR. Además de que se encontró que clínicamente hay una mejoría significativa, a su vez que la histología lo comprueba, se podría determinar que el AI es un mecanismo eficaz para disminuir el patrón inflamatorio.

Sin embargo, reconocemos algunas áreas de oportunidad del estudio. Se trata de un estudio preclínico que, aunque por primera vez detalla varios mecanismos moleculares modificados por la AI en la artritis, requiere confirmación en pacientes con la enfermedad. Además, el perfil transcriptómico no representa todos los eventos celulares, y aunque la disminución de la inflamación fue confirmada clínica e histológicamente, se dejan de lado importantes aspectos moleculares, incluyendo procesos de regulación epigenética; por lo que aún son necesarias evaluaciones mediante epigenómica, proteómica e incluso metagenómica.

Dado que la AI no influye significativamente en los efectos de las intervenciones farmacológicas, podría considerarse una alternativa adyuvante para mejorar la respuesta al tratamiento actual. La AI afecta positivamente a varias afecciones inflamatorias y es segura para la mayoría de los pacientes. Nuestro trabajo muestra un beneficio potencial explicado por la intervención de la AI sobre procesos patogénicos clave en la CIA; por lo tanto, merece la pena explorarla en pacientes humanos con AR.



15. REFERENCIAS

1. Wu X. Innate Lymphocytes in Inflammatory Arthritis. *Front Immunol.* 25 de septiembre de 2020;11:565275.
2. Harrison TR, Kasper DL. Harrison, principios de medicina interna. Volumen 2 Volumen 2. Vol. 2. México: McGraw-Hill; 2016.
3. Philippou E, Petersson SD, Rodomar C, Nikiphorou E. Rheumatoid arthritis and dietary interventions: systematic review of clinical trials. *Nutr Rev.* 9 de marzo de 2021;79(4):410-28.
4. Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, Koretzky GA, McInnes IB, O'Dell JR. Firestein & Kelley's textbook of rheumatology. 11.^a ed. Philadelphia: Elsevier, Inc; 2020.
5. Zhang L, Zhang YJ, Chen J, Huang XL, Fang GS, Yang LJ, et al. The association of HLA-B27 and Klebsiella pneumoniae in ankylosing spondylitis: A systematic review. *Microb Pathog.* abril de 2018;117:49-54.
6. Derksen VFAM, Huizinga TWJ, van der Woude D. The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol.* junio de 2017;39(4):437-46.
7. Athanassiou P, Athanassiou L, Kostoglou-Athanassiou I. Nutritional Pearls: Diet and Rheumatoid Arthritis. *Mediterr J Rheumatol.* 2020;31(3):319.
8. Sonnenberg GF, Artis D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med.* julio de 2015;21(7):698-708.
9. Seillet C, Jacquelot N. Sensing of physiological regulators by innate lymphoid cells. *Cell Mol Immunol.* mayo de 2019;16(5):442-51.



10. Van Kaer L, Postoak JL, Wang C, Yang G, Wu L. Innate, innate-like and adaptive lymphocytes in the pathogenesis of MS and EAE. *Cell Mol Immunol.* junio de 2019;16(6):531-9.
11. Alamanos Y, Drosos A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* marzo de 2005;4(3):130-6.
12. Pelaez-Ballestas I, Sanin LH, Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Burgos-Vargas R, Garza-Elizondo M, et al. Epidemiology of the Rheumatic Diseases in Mexico. A Study of 5 Regions Based on the COPCORD Methodology. *J Rheumatol Suppl.* 1 de enero de 2011;86(0):3-8.
13. Genel F, Kale M, Pavlovic N, Flood VM, Naylor JM, Adie S. Health effects of a low-inflammatory diet in adults with arthritis: a systematic review and meta-analysis. *J Nutr Sci.* 2020;9:e37.
14. Miranda Limón JM. REUMATOLOGÍA EN LA CLÍNICA GENERAL: Fundamentos del Diagnóstico y la Terapéutica. México: Comexfarma de México; 2017. 700 p.
15. Jar AM. Bienestar animal y el uso de animales de laboratorio en la experimentación científica. *Rev Argent Microbiol.* 1 de abril de 2014;46(2):77-9.
16. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Internet]. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011 [citado 17 de noviembre de 2019]. (The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>



17. 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*. 19 de diciembre de 2012;14(1):10.
18. Bessis N, Decker P, Assier E, Semerano L, Boissier MC. Arthritis models: usefulness and interpretation. *Semin Immunopathol*. junio de 2017;39(4):469-86.
19. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc*. 2007;2(5):1269-75.
20. Caplazi P, Baca M, Barck K, Carano RAD, DeVoss J, Lee WP, et al. Mouse Models of Rheumatoid Arthritis. *Vet Pathol*. septiembre de 2015;52(5):819-26.
21. Quiñonez-Flores CM, López-Loeza SM, Pacheco-Tena C, Muñoz-Morales PM, Acosta-Jiménez S, González-Chávez SA. Stability of housekeeping genes in inflamed joints of spontaneous and collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al*. mayo de 2021;70(5):619-32.
22. Longo VD, Mattson MP. Fasting: Molecular Mechanisms and Clinical Applications. *Cell Metab*. febrero de 2014;19(2):181-92.
23. Secor SM, Carey HV. Integrative Physiology of Fasting. *Compr Physiol*. 15 de marzo de 2016;6(2):773-825.
24. Li G, Xie C, Lu S, Nichols RG, Tian Y, Li L, et al. Intermittent Fasting Promotes White Adipose Browning and Decreases Obesity by Shaping the Gut Microbiota. *Cell Metab*. octubre de 2017;26(4):672-685.e4.
25. Lima CHR, Oliveira IKF, Frota K de MG, Carvalho CMRG de, Paiva A de A, Campelo V, et al. Impact of intermittent fasting on body weight in overweight and obese individuals. *Rev Assoc Medica Bras* 1992. 15 de mayo de 2020;66(2):222-6.



26. Correia JM, Santos I, Pezarat-Correia P, Minderico C, Mendonca GV. Effects of Intermittent Fasting on Specific Exercise Performance Outcomes: A Systematic Review Including Meta-Analysis. *Nutrients*. 12 de mayo de 2020;12(5):E1390.
27. Cho Y, Hong N, Kim KW, Cho SJ, Lee M, Lee YH, et al. The Effectiveness of Intermittent Fasting to Reduce Body Mass Index and Glucose Metabolism: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med*. 9 de octubre de 2019;8(10):E1645.
28. Crupi AN, Haase J, Brandhorst S, Longo VD. Periodic and Intermittent Fasting in Diabetes and Cardiovascular Disease. *Curr Diab Rep*. diciembre de 2020;20(12):83.
29. de Cabo R, Mattson MP. Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 26 de diciembre de 2019;381(26):2541-51.
30. Dedual MA, Wueest S, Borsigova M, Konrad D. Intermittent fasting improves metabolic flexibility in short-term high-fat diet-fed mice. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 1 de noviembre de 2019;317(5):E773-82.
31. Dwaib HS, AlZaim I, Eid AH, Obeid O, El-Yazbi AF. Modulatory Effect of Intermittent Fasting on Adipose Tissue Inflammation: Amelioration of Cardiovascular Dysfunction in Early Metabolic Impairment. *Front Pharmacol*. 9 de abril de 2021;12:626313.
32. Wang X, Yang Q, Liao Q, Li M, Zhang P, Santos HO, et al. Effects of intermittent fasting diets on plasma concentrations of inflammatory biomarkers: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition*. noviembre de 2020;79-80:110974.



33. Mindikoglu AL, Abdulsada MM, Jain A, Choi JM, Jalal PK, Devaraj S, et al. Intermittent fasting from dawn to sunset for 30 consecutive days is associated with anticancer proteomic signature and upregulates key regulatory proteins of glucose and lipid metabolism, circadian clock, DNA repair, cytoskeleton remodeling, immune system and cognitive function in healthy subjects. *J Proteomics*. abril de 2020;217:103645.
34. Harvie MN, Howell T. Could Intermittent Energy Restriction and Intermittent Fasting Reduce Rates of Cancer in Obese, Overweight, and Normal-Weight Subjects? A Summary of Evidence. *Adv Nutr Int Rev J*. julio de 2016;7(4):690-705.
35. Mattson MP, Longo VD, Harvie M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes. *Ageing Res Rev*. octubre de 2017;39:46-58.
36. Faris MAIslamE, Salem M, Jahrami H, Madkour M, BaHammam A. Ramadan intermittent fasting and immunity: An important topic in the era of COVID-19. *Ann Thorac Med*. 2020;15(3):125.
37. Venetsanopoulou AI, Voulgari PV, Drosos AA. Fasting mimicking diets: A literature review of their impact on inflammatory arthritis. *Mediterr J Rheumatol*. 2019;30(4):201.
38. Ben Nessib D, Maatallah K, Ferjani H, Triki W, Kaffel D, Hamdi W. Sustainable positive effects of Ramadan intermittent fasting in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. febrero de 2022;41(2):399-403.
39. Adawi M, Damiani G, Bragazzi N, Bridgwood C, Pacifico A, Conic R, et al. The Impact of Intermittent Fasting (Ramadan Fasting) on Psoriatic Arthritis Disease Activity, Enthesitis, and Dactylitis: A Multicentre Study. *Nutrients*. 12 de marzo de 2019;11(3):601.



40. Bagherniya M, Butler AE, Barreto GE, Sahebkar A. The effect of fasting or calorie restriction on autophagy induction: A review of the literature. *Ageing Res Rev.* noviembre de 2018;47:183-97.
41. Ben Nessib D, Maatallah K, Ferjani H, Kaffel D, Hamdi W. Impact of Ramadan diurnal intermittent fasting on rheumatic diseases. *Clin Rheumatol.* agosto de 2020;39(8):2433-40.
42. Cignarella F, Cantoni C, Ghezzi L, Salter A, Dorsett Y, Chen L, et al. Intermittent Fasting Confers Protection in CNS Autoimmunity by Altering the Gut Microbiota. *Cell Metab.* junio de 2018;27(6):1222-1235.e6.
43. Klempel MC, Kroeger CM, Varady KA. Alternate day fasting (ADF) with a high-fat diet produces similar weight loss and cardio-protection as ADF with a low-fat diet. *Metabolism.* enero de 2013;62(1):137-43.
44. Samvelyan HJ, Mathers JC, Skerry TM. Feeding intervention potentiates the effect of mechanical loading to induce new bone formation in mice. *FASEB J* [Internet]. octubre de 2021 [citado 18 de noviembre de 2021];35(10). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.202100334RR>
45. Wilson R, Deasy W, Stathis C, Hayes A, Cooke M. Intermittent Fasting with or without Exercise Prevents Weight Gain and Improves Lipids in Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients.* 12 de marzo de 2018;10(3):346.
46. Blomjous B, Boers M, Den Uyl D, Twisk J, Van Schaardenburg D, Voskuyl A, et al. Predictors of sick leave and improved worker productivity after 52 weeks of intensive treatment in patients with early rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 4 de julio de 2019;48(4):271-8.
47. Gamboa-Cárdenas RV, Ugarte-Gil MF, Massardo L, Sacnun MP, Saurit V, Cardiel MH, et al. Correction to: Clinical predictors of remission and low disease



activity in Latin American early rheumatoid arthritis: data from the GLADAR cohort. Clin Rheumatol [Internet]. 20 de agosto de 2019 [citado 15 de octubre de 2019]; Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10067-019-04742-8>

48. Zhao SS, Robertson S, Reich T, Harrison NL, Moots RJ, Goodson NJ. Prevalence and impact of comorbidities in axial spondyloarthritis: systematic review and meta-analysis. Rheumatology. 1 de octubre de 2020;59(Supplement_4):iv47-57.

49. Babu S, Vaish A, Vaishya R, Agarwal A. Can intermittent fasting be helpful for knee osteoarthritis? J Clin Orthop Trauma. mayo de 2021;16:70-4.

50. Dai S, Wei J, Zhang H, Luo P, Yang Y, Jiang X, et al. Intermittent fasting reduces neuroinflammation in intracerebral hemorrhage through the Sirt3/Nrf2/HO-1 pathway. J Neuroinflammation. diciembre de 2022;19(1):122.

51. Lückemann L, Stangl H, Straub RH, Schedlowski M, Hadamitzky M. Learned immunosuppressive placebo response attenuates disease progression in a rodent model of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheumatol Hoboken NJ. 11 de septiembre de 2019;

52. Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP, Rivera Muñoz B. Kuby inmunología [Internet]. México [etc.: McGraw Hill; 2015 [citado 17 de noviembre de 2019]. Disponible en: http://www.ingebook.com/ib/NPcd/IB_Escritorio_Visualizar?cod_primaria=1000193&libro=5714

53. Gargiulo S, Greco A, Gramanzini M, Esposito S, Affuso A, Brunetti A, et al. Mice Anesthesia, Analgesia, and Care, Part I: Anesthetic Considerations in Preclinical Research. ILAR J. 1 de marzo de 2012;53(1):E55-69.



54. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol.* enero de 1995;57(1):289-300.
55. Muñoz LIO. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999, ESPECIFICACIONES TECNICAS PARA LA PRODUCCION, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO. 2001;
56. Liu DY, Zhao HM, Cheng SM, Rao Y, Huang XY, Zuo ZQ, et al. Scorpio and Scolopendra attenuate inflammation and articular damage in rats with collagen-induced arthritis. *J Ethnopharmacol.* junio de 2012;141(2):603-7.
57. Tanner MR, Pennington MW, Chamberlain BH, Huq R, Gehrman EJ, Laragione T, et al. Targeting KCa1.1 Channels with a Scorpion Venom Peptide for the Therapy of Rat Models of Rheumatoid Arthritis. *J Pharmacol Exp Ther.* mayo de 2018;365(2):227-36.
58. Vadell AK, Bärebring L, Hulander E, Gjertsson I, Lindqvist HM, Winkvist A. Anti-inflammatory Diet In Rheumatoid Arthritis (ADIRA)—a randomized, controlled crossover trial indicating effects on disease activity. *Am J Clin Nutr.* junio de 2020;111(6):1203-13.
59. Ciaffi J, Mitselman D, Mancarella L, Brusi V, Lisi L, Ruscitti P, et al. The Effect of Ketogenic Diet on Inflammatory Arthritis and Cardiovascular Health in Rheumatic Conditions: A Mini Review. *Front Med.* 14 de diciembre de 2021;8:792846.
60. Teng MWL, Bowman EP, McElwee JJ, Smyth MJ, Casanova JL, Cooper AM, et al. IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat Med.* julio de 2015;21(7):719-29.
61. Yokota K, Sato K, Miyazaki T, Aizaki Y, Tanaka S, Sekikawa M, et al. Characterization and Function of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-6–Induced



Osteoclasts in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* julio de 2021;73(7):1145-54.

62. Wang C, Zhang X, Luo L, Luo Y, Yang X, Ding X, et al. Adipocyte-derived PGE2 is required for intermittent fasting–induced Treg proliferation and improvement of insulin sensitivity. *JCI Insight.* 8 de marzo de 2022;7(5):e153755.

63. Lahoti TS, Hughes JM, Kusnadi A, John K, Zhu B, Murray IA, et al. Aryl hydrocarbon receptor antagonism attenuates growth factor expression, proliferation, and migration in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J Pharmacol Exp Ther.* febrero de 2014;348(2):236-45.

64. Fukuda K, Miura Y, Maeda T, Hayashi S, Matsumoto T, Kuroda R. Expression profiling of genes in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes regulated by Fas ligand via cDNA microarray analysis. *Exp Ther Med.* septiembre de 2021;22(3):1000.

65. Hui X, Zhu W, Wang Y, Lam KSL, Zhang J, Wu D, et al. Major Urinary Protein-1 Increases Energy Expenditure and Improves Glucose Intolerance through Enhancing Mitochondrial Function in Skeletal Muscle of Diabetic Mice. *J Biol Chem.* mayo de 2009;284(21):14050-7.

66. Giller K, Huebbe P, Doering F, Pallauf K, Rimbach G. Major urinary protein 5, a scent communication protein, is regulated by dietary restriction and subsequent re-feeding in mice. *Proc Biol Sci.* 22 de abril de 2013;280(1757):20130101.

67. Tateiwa, Yoshikawa, Kaito. Cartilage and Bone Destruction in Arthritis: Pathogenesis and Treatment Strategy: A Literature Review. *Cells.* 2 de agosto de 2019;8(8):818.

68. Ben Achour W, Bouaziz M, Mechri M, Zouari B, Bahlous A, Abdelmoula L, et al. A cross sectional study of bone and cartilage biomarkers: correlation with



structural damage in rheumatoid arthritis. *Libyan J Med.* enero de 2018;13(1):1512330.

69. Cai P, Lu Z, Jiang T, Wang Z, Yang Y, Zheng L, et al. Syndecan-4 involves in the pathogenesis of rheumatoid arthritis by regulating the inflammatory response and apoptosis of fibroblast-like synoviocytes. *J Cell Physiol.* febrero de 2020;235(2):1746-58.

70. Tyagi N, Mehla K, Gupta D. Deciphering novel common gene signatures for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus by integrative analysis of transcriptomic profiles. Taneja V, editor. *PLOS ONE.* 16 de marzo de 2023;18(3):e0281637.

71. Ouyang T, Song L, Fang H, Tan J, Zheng Y, Yi J. Potential mechanistic roles of Interleukin-33 in rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol.* octubre de 2023;123:110770.

72. Miller AM, Asquith DL, Hueber AJ, Anderson LA, Holmes WM, McKenzie AN, et al. Interleukin-33 induces protective effects in adipose tissue inflammation during obesity in mice. *Circ Res.* 3 de septiembre de 2010;107(5):650-8.

73. Barati M, Ghahremani A, Namdar Ahmadabad H. Intermittent fasting: A promising dietary intervention for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* octubre de 2023;22(10):103408.

74. Cheng W, Desmet L, Depoortere I. Time-restricted eating for chronodisruption-related chronic diseases. *Acta Physiol.* 8 de agosto de 2023;e14027.

75. Tibi S, Ahmed S, Nizam Y, Aldoghmi M, Moosa A, Bourenane K, et al. Implications of Ramadan Fasting in the Setting of Gastrointestinal Disorders. *Cureus.* marzo de 2023;15(3):e36972.



76. Diab A, Dastmalchi LN, Gulati M, Michos ED. A Heart-Healthy Diet for Cardiovascular Disease Prevention: Where Are We Now? *Vasc Health Risk Manag.* abril de 2023;Volume 19:237-53.
77. Herz D, Haupt S, Zimmer RT, Wachsmuth NB, Schierbauer J, Zimmermann P, et al. Efficacy of Fasting in Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus: A Narrative Review. *Nutrients.* 10 de agosto de 2023;15(16):3525.
78. Chaudhary MR, Chaudhary S, Sharma Y, Singh TA, Mishra AK, Sharma S, et al. Aging, oxidative stress and degenerative diseases: mechanisms, complications and emerging therapeutic strategies. *Biogerontology.* octubre de 2023;24(5):609-62.
79. Anemoulis M, Vlastos A, Kachtsidis V, Karras SN. Intermittent Fasting in Breast Cancer: A Systematic Review and Critical Update of Available Studies. *Nutrients.* 19 de enero de 2023;15(3):532.
80. Zhou J, Li H, Xia X, Herrera A, Pollock N, Reebye V, et al. Anti-inflammatory Activity of MTL-CEBPA, a Small Activating RNA Drug, in LPS-Stimulated Monocytes and Humanized Mice. *Mol Ther.* mayo de 2019;27(5):999-1016.
81. Jeong M, Cho J, Shin JI, Jeon YJ, Kim JH, Lee SJ, et al. Hempseed oil induces reactive oxygen species- and C/EBP homologous protein-mediated apoptosis in MH7A human rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cells. *J Ethnopharmacol.* julio de 2014;154(3):745-52.
82. Li Z, Chen M, Wang Z, Fan Q, Lin Z, Tao X, et al. Berberine inhibits RA-FLS cell proliferation and adhesion by regulating RAS/MAPK/FOXO/HIF-1 signal pathway in the treatment of rheumatoid arthritis. *Bone Jt Res.* 1 de febrero de 2023;12(2):91-102.



83. Liu Y, Yan X. Eriodictyol inhibits survival and inflammatory responses and promotes apoptosis in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes through AKT/FOXO1 signaling. *J Cell Biochem.* septiembre de 2019;120(9):14628-35.
84. Garg NK, Tyagi RK, Singh B, Sharma G, Nirbhavane P, Kushwah V, et al. Nanostructured lipid carrier mediates effective delivery of methotrexate to induce apoptosis of rheumatoid arthritis via NF- κ B and FOXO1. *Int J Pharm.* febrero de 2016;499(1-2):301-20.
85. Quiñonez-Flores CM, González-Chávez SA, Pacheco-Tena C. Hypoxia and its implications in rheumatoid arthritis. *J Biomed Sci.* diciembre de 2016;23(1):62.
86. Hong Z, Tie Q, Zhang L. Targeted inhibition of the GRK2/HIF-1 α pathway is an effective strategy to alleviate synovial hypoxia and inflammation. *Int Immunopharmacol.* diciembre de 2022;113:109271.
87. Li X feng, Yin S qin, Li H, Yang Y li, Chen X, Song B, et al. PPAR- γ alleviates the inflammatory response in TNF- α -induced fibroblast-like synoviocytes by binding to p53 in rheumatoid arthritis. *Acta Pharmacol Sin.* febrero de 2023;44(2):454-64.
88. Wang R, Ji C, Feng D, Wu Y, Li Y, Olatunji OJ, et al. Consumption of Saturated Fatty Acids-Rich Lard Benefits Recovery of Experimental Arthritis by Activating PPAR- γ . *Mol Nutr Food Res.* enero de 2023;67(2):2200429.
89. Miao Y, Wu X, Xue X, Ma X, Yang L, Zeng X, et al. Morin, the PPAR γ agonist, inhibits Th17 differentiation by limiting fatty acid synthesis in collagen-induced arthritis. *Cell Biol Toxicol.* agosto de 2023;39(4):1433-52.
90. Li C, Zhang H, Wu H, Li R, Wen D, Tang Y, et al. Intermittent fasting reverses the declining quality of aged oocytes. *Free Radic Biol Med.* febrero de 2023;195:74-88.



91. Ng GYQ, Kang SW, Kim J, Alli-Shaik A, Baik SH, Jo DG, et al. Genome-Wide Transcriptome Analysis Reveals Intermittent Fasting-Induced Metabolic Rewiring in the Liver. Dose-Response. 1 de julio de 2019;17(3):155932581987678.
92. Hakvoort TBM, Moerland PD, Frijters R, Sokolović A, Labruyère WT, Vermeulen JLM, et al. Interorgan Coordination of the Murine Adaptive Response to Fasting. J Biol Chem. mayo de 2011;286(18):16332-43.
93. Qian J, Fang Y, Yuan N, Gao X, Lv Y, Zhao C, et al. Innate immune remodeling by short-term intensive fasting. Aging Cell. noviembre de 2021;20(11):e13507.
94. Han K, Singh K, Rodman MJ, Hassanzadeh S, Wu K, Nguyen A, et al. Fasting-induced FOXO4 blunts human CD4+ T helper cell responsiveness. Nat Metab. marzo de 2021;3(3):318-26.