



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



ACTIVIDAD ANGIOGÉNICA Y APOPTÓTICA EN LA
ARTRITIS MURINA INDUCIDA CON COLÁGENO
BOVINO TIPO II

PAULA ANDREA ABELLO CÁCERES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Patología Animal

PROFESOR GUIA: CARLOS GONZÁLEZ RIVEROS

SANTIAGO, CHILE
2007

Financiado por FONDECYT, 1040860.

DEDICATORIA

A mis padres por su inagotable amor, paciencia y apoyo. A mi Luz, por cada uno de los días dedicados a mi, enseñándome la belleza de las cosas sencillas de la vida y a mis abuelos por darme su protección día a día.

AGRADECIMIENTOS

A toda mi familia padres, hermano, cuñada por toda la paciencia, a mi sobrino Rorrito por ser mi hermanito menor, a mis únicas y más grandes amigas Pao, Joha y Carlita por su gran apoyo incondicional y estar siempre que las necesito (mareos), a mis tíos Bety y Narsi y primos por sus siempre cariños, a mi “tía Maru” por todos sus rezos, a Miguel Sepúlveda por todas las jornadas de trabajo y desordenes, Don Manolito por mal enseñarme y por todo su cariño, Doctora Raquel Cepeda por su gran aporte en el escrito de esta tesis, Doctor Carlos González por ser más que un maestro un gran amigo, Juan Carlos Aguillón por su gran paciencia y darme la oportunidad de trabajar en este gran proyecto, Lorena Salazar por todas las lecciones, a todos mis compañeros del programa disciplinario de Inmunología en medicina por su apoyo siempre, en especial Adam (tuviste la mala suerte de vivir cerca mío), a mi “Tía Susana” por ser la mejor secretaria que veterinaria a tenido, Doctora Valeria Rojas por su gran voluntad, a mi gran compañero Leo Videla por ser un amigo, a mi abuela por darme el ejemplo, a los animales, por ser mi fuente de inspiración y a mi gran amigo, que sin el nada hubiese sido posible, Dios.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
RESUMEN	
Palabras claves	
SUMMARY	
Key Words	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	3
2.1. Histología.....	4
2.1.1. Membrana sinovial.....	4
2.1.2. Membrana sinovial en artritis reumatoide.....	5
2.2. Angiogénesis.....	6
2.2.1. Angiogénesis en artritis reumatoide.....	7
2.2.2. Marcadores de angiogénesis.....	8
2.3 Apoptosis.....	9
2.3.1. Apoptosis en artritis reumatoide.....	10
2.3.2 Detección de apoptosis.....	11
2.4 Diferencias entre necrosis y apoptosis.....	13
3. HIPÓTESIS.....	15
4. OBJETIVO GENERAL.....	15
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16

6.1. Animales.....	16
6.2. Inducción de artritis con colágeno bovino tipo II (CIA).....	16
6.3. Muestras.....	16
6.4. Análisis histopatológico.....	18
6.4.1.Índice de densidad celular en membrana sinovial (IDCMS)...	18
6.4.2.Puntaje de daño histopatológico a nivel de cartílago articular.	18
6.4.3. Grado de fibrosis.....	19
6.5. Técnicas inmunohistoquímica.....	19
6.5.1. Inmunotinción para angiogénesis.....	19
6.5.2. Inmunotinción para apoptosis.....	20
6.6. Digitalización de imágenes.....	21
6.7. Análisis estadístico.....	22
7. RESULTADOS.....	23
7.1. Análisis histopatológico.....	23
7.2. Índice artrítico.....	25
7.3. Índice de densidad celular en membrana sinovial.....	26
7.4. Puntaje de daño histopatológico a nivel de cartílago articular:...	28
7.5. Fibrosis.....	30
7.6. Inmunohistoquímica.....	33
7.6.1. Angiogénesis.....	33
7.6.1.1. Área inmunomarcada para factor endotelial de von Willenbrand en membrana sinovial.....	33
7.6.1.2. Índice del área de lecho vascular.....	36
7.6.1.3. Apoptosis en cartílago articular.....	38

7.7. Análisis de correlación.....	41
8. DISCUSIÓN.....	43
9. CONCLUSIONES.....	47
10. BIBLIOGRAFÍA.....	48

ANEXOS

- Anexo N° 1
- Anexo N° 2
- Anexo N° 3

RESUMEN

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune sistémica crónica que se caracteriza por presentar hipertrofia de la membrana sinovial, formando un tejido de granulación llamado *pannus*, el que invade y destruye hueso y cartílago. Uno de los eventos que facilitan la perpetuación de la enfermedad es la formación de nuevos capilares que permiten la llegada de más células inflamatorias al sitio y la posterior hipertrofia de la membrana sinovial.

El presente trabajo estudia, en el curso de la enfermedad, el proceso de angiogénesis a nivel de la membrana sinovial y su relación con cambios histopatológicos indicadores de severidad del daño articular considerando tanto infiltración leucocitaria y fibrosis a nivel de membrana sinovial, como apoptosis y destrucción histológica a nivel del cartílago. Para esto, se usó un modelo murino de artritis reumatoide inducida con colágeno tipo II (CIA). Se sacrificaron 6 ratones de la cepa DBA1/lacJ (H2^q), a los 14, 28, 42, 56 y 70 días post inducción (d.p.i) de CIA. En cada fecha se sacrificaron 3 controles.

La sintomatología clínica comenzó a observarse a partir de los 28 d.p.i. con un índice artrítico promedio de $1,00 \pm 0,81$ correspondiente a eritema articular. El cuadro avanzó hacia los 70 d.p.i. con un índice artrítico promedio de $3,83 \pm 0,40$ correspondiente a edema y deformación máxima, con anquilosis.

La morfometría computarizada permitió en este estudio demostrar que, en relación a los controles, la inducción de CIA, produce aumento significativo ($p < 0.05$) del área vascular efectiva en la membrana sinovial a los 42 d.p.i. que se correlaciona con aumento también significativo ($p < 0.05$) en la acumulación de células inflamatorias, fibrosis y destrucción del cartílago. El

área vascular efectiva se estimó calculando el índice de vascularización (área lecho vascular/área de membrana sinovial) que se hizo significativo al igual que en los otros casos a los 42 d.p.i. Sin embargo, al medir el área de inmunomarcación del factor endotelial de Von Willenbrand se observaron aumentos significativos en comparación a sus respectivos controles ($p < 0,05$), más temprano, a partir del día 28. Esto indica que la reactivación endotelial con proliferación se hace significativa antes que se forme un área vascular efectiva. El índice apoptótico fue un indicador más temprano de daño en el cartílago articular, haciéndose significativo respecto a su control también a partir del día 28. El aumento del índice de severidad clínica (índice artrítico) está altamente correlacionado con el aumento de angiogénesis $r = 0,95$ ($p < 0,05$) y apoptosis $r = 0,90$ ($p < 0,05$).

Por otra parte, la histopatología convencional en conjunto con la inmunohistoquímica permitieron detectar cambios, que aunque discretos, son claros indicadores del comienzo del establecimiento del proceso inflamatorio como son la aparición de PMN neutrófilos en la membrana sinovial, proliferación endotelial con desarrollo de brotes angiogénicos y el aumento de la actividad apoptótica de condrocitos, que ocurren en forma más temprana y coincidieron con los primeros síntomas clínicos de la enfermedad que se detectaron a los 28 d.p.i., registrando un índice artrítico grado 1, correspondiente a eritema articular.

Palabras claves: Artritis reumatoide, CIA, pannus, angiogénesis, apoptosis, histopatología.

SUMMARY

Rheumatoid arthritis is a systemic chronic autoimmune disease that is characterized by synovial membrane hypertrophy, forming a granulation tissue called *pannus*, that invades and destroys underlying bone and cartilage. One of the events that facilitate the perpetuation of the illness is the formation of new capillaries that allow the arrival of more inflammatory cells to the place and the later hypertrophy of the synovial membrane.

The present work studies, along the course of the illness, the angiogenesis process at the synovial membrane level and its relationship with histopathological changes indicating severity of the articular damage, considering leukocyte infiltration and fibrosis at this level, as well as apoptosis and histopathological damage at the cartilage level. For this, a murine model of rheumatoid arthritis was induced with bovine type II collagen (CIA). Six DBA1/lacJ (H2^g) mice were sacrificed at the 14, 28, 42, 56 and 70 days post induction (d.p.i) of CIA. In each date 3 control mice were sacrificed.

The clinical symptoms began to be observed starting from the 28 d.p.i. with an average arthritic index of 1.00 ± 0.81 corresponding to erythema of the articulation. The disease advanced toward the 70 d.p.i. with an average arthritic index of 3.83 ± 0.40 corresponding to edema and maximum deformation, with ankylosis.

Computerized morphometry allowed in this study to demonstrate that, in comparison to controls, the induction of CIA, it produces significant increase ($p < 0.05$) of the effective vascular area in the synovial membrane after 42 d.p.i. that is also correlated with a significant increase ($p < 0.05$) in the accumulation of inflammatory cells, fibrosis and destruction of the cartilage.

The effective vascular area was calculated as the vascularization index (vascular area/synovial membrane area) that also became significant after 42 d.p.i. However, when measuring the area of immune staining of the endothelial factor of Von Willenbrand significant increases in comparison to controls were observed ($p < 0.05$), earlier, starting from 28 d.p.i. This indicates that the activation and proliferation of endothelium becomes significant before an effective vascular area is formed. The apoptosis index was also an earlier indicator of damage in the cartilage becoming significant in comparison to controls starting from day 28 d.p.i.. The increase in the index of clinical severity (arthritic index) is highly correlated with the increase in both angiogenesis $r = 0.95$ ($p < 0.05$) and apoptosis $r = 0.90$ ($p < 0.05$).

On the other hand, the conventional histopathology together with immunohistochemistry allowed to detect changes that although discreet are clear indications of the initiation of the establishment of the inflammatory process as are the appearance of PMN neutrophils in the synovial membrane, endothelial proliferation with development of angiogenic buds and the increase of the apoptotic activity in chondrocytes and they coincided with the first clinical symptoms of the illness that were detected at 28 d.p.i. registering an average arthritic index of 1, corresponding to eritema of articulation.

Key Words: Rheumatoid arthritis, CIA, pannus, angiogenesis, apoptosis, histhopatology.

1. INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide es una enfermedad sistémica, autoinmune, de carácter inflamatorio, que se caracteriza por presentar una hipertrofia de la membrana sinovial, que se va haciendo crónica en el tiempo hasta formar un tejido de granulación llamado *pannus*, el que invade hueso y cartílago articular llevándolos a su destrucción.

En su etiopatogénia participan una gran variedad de tipos celulares, comenzando el proceso con una anormal presentación de auto-antígenos por parte de las células dendríticas a linfocitos T CD4+ auto reactivos, los cuales, una vez activados, secretan citoquinas tales como interleuquina 17 (IL-17), estimulando a macrófagos a secretar interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 6 (IL6) y factor de necrosis tumoral (TNF α).

La sobre-expresión de TNF α e IL-1 serían vitales en la generación del proceso inflamatorio y en la ejecución del daño articular. Es a nivel de la membrana sinovial donde se centra nuestra atención, la disminución de células apoptóticas trae como consecuencia un aumento en el número de sinoviocitos, lo que se traduce en una membrana conformada hasta por nueve capas celulares, estando normalmente compuesta de tres. Es por esta razón que se crea un microambiente hipóxico, el que sumado a los estímulos que producen los linfocitos y macrófagos activados y fibroblastos sinoviales, gatillan la neoformación de vasos sanguíneos (angiogénesis) en la membrana sinovial. A través de estos capilares es por donde llegarán las células inflamatorias a invadir el tejido sinovial, además de permitirle su nutrición y posterior proliferación perpetuando aún más el daño articular.

En este trabajo de tesis, se utilizó un modelo murino de artritis inducida por colágeno tipo II (CIA). Este modelo se caracteriza por la inflamación de múltiples articulaciones, acompañada de hiperplasia sinovial. En éste se

estudiaron los procesos de angiogénesis y apoptosis, en relación al desarrollo de las lesiones histopatológicas que ocurren en esta enfermedad. Los resultados podrán servir como punto de referencia para futuras investigaciones que tengan como base la aplicación de posibles terapias enfocadas a combatir la apoptosis y la formación de estos nuevos vasos, ya que se acepta que estos eventos son cruciales en el progreso y mantención de la enfermedad.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Las enfermedades autoinmunes son la consecuencia final de una cascada secuencial de sucesos inmunológicos, iniciada y perpetuada por factores ambientales que ocurren en un individuo genéticamente susceptible. Hoy en día se conocen aproximadamente 70 enfermedades autoinmunes diferentes, las cuales constituyen uno de los problemas de salud más frecuentes, y al mismo tiempo, uno de los fenómenos inmunológicos menos entendidos. Éstas se desarrollan cuando la respuesta inmune específica es montada contra los antígenos propios, generándose una respuesta de los linfocitos T y una inadecuada activación de macrófagos y otras células efectoras. Además, se produce una activación de células B autoreactivas con la subsecuente secreción de anticuerpos autoreactivos (Janeway *et al.*, 1999).

Una de las enfermedades autoinmunes de mayor prevalencia es la artritis reumatoide, enfermedad sistémica que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial. Esta se caracteriza por una inflamación crónica y progresiva de la membrana sinovial de las articulaciones. Presenta un amplio espectro de severidad clínica, que va desde la artritis leve hasta una forma invalidante que se caracteriza por tener altos títulos de factor reumatoideo y compromiso vital de otros órganos, que conducen a una significativa incapacidad y una consecuente reducción en la calidad de vida (Wicks *et al.*, 1994).

En su patogenia participa una gran variedad de tipos celulares y el proceso auto-inmune está dado por una anormal presentación de auto-antígenos por parte de las células dendríticas (células presentadoras de antígenos), esto conduce a la activación de linfocitos T CD4+ autoreactivos. Estas células T activadas, son los mediadores centrales del daño en la

articulación, ya que a través de secretar IL-17 e interferón gamma (IFN γ) inducen a los macrófagos a secretar IL-6, IL-1 y TNF α , siendo estas dos últimas citoquinas vitales en la ejecución del daño articular (Smolen y Steiner, 2003).

2.1 HISTOLOGÍA

2.1.1. Membrana sinovial:

La cápsula articular, está compuesta de dos capas, una externa llamada “capa fibrosa”, compuesta de una densa capa de tejido conectivo y una interna conocida como membrana sinovial o sinovia (Thoshihico *et al.*, 2000).

Se acepta que el tejido sinovial normal, caracterizado por una capa superficial de células, también denominada intima sinovial, está formado principalmente por fibroblastos, macrófagos, adipocitos, mastocitos, fibras nerviosas, capilares, ocasionalmente polimorfo nucleares y linfocitos (Henderson y Edward, 1987). La intima sinovial, se compone principalmente por dos tipos celulares: las Tipo A, que se originan de la médula ósea y presentan criterios ultraestructurales de monocitos que derivan a macrófagos, expresan marcadores de superficie como el CD68 y CD14 y se tiñen esterasa no específica (Athanasou y Quinn, 1991) y las células Tipo B, que son fibroblastos, y pueden distinguirse tanto citoquímica como histoquímicamente de los fibroblastos de tejidos más profundos (Edwards, 1994). Estudios realizados en conejo y ratón, han revelado que son las células del tipo fibroblastos las que predominan en la sinovia, siendo entre un 75% a 80% de las células que componen dicha membrana, respectivamente (Krey y Cohen, 1973).

En cuanto a la vascularidad, estudios en membrana sinovial normal, describen un alto porcentaje de capilares cuya densidad bajo la intima sinovial, fluctúa entre $6 \mu\text{m}^2$ y $11 \mu\text{m}^2$ (Knight y Levick, 1983).

2.1.2. Membrana sinovial en artritis reumatoide:

La inflamación a nivel de la membrana sinovial es el cambio central en la patofisiología de la artritis reumatoide (Lee y Weinblatt, 2001). Histológicamente, se caracteriza por presentar una pronunciada angiogénesis, hiperplasia celular, infiltración de leucocitos inflamatorios y cambios en la expresión de moléculas de adhesión en la superficie, proteinasas, inhibidores de proteinasas y variadas citoquinas (Lee y Weinblatt, 2001).

La excesiva proliferación, que experimenta la membrana sinovial, provoca cambios en la estructura de esta membrana e induce a la formación de un tejido de granulación que se denomina *pannus* (Barberá y Domínguez, 2004). El *pannus* se comporta de manera idéntica a un tumor multicéntrico invasivo, que invade y destruye su entorno local. Este tejido es el responsable de las erosiones que se observan en artritis reumatoidea (Barberá y Domínguez, 2004). En una primera fase, el *pannus* celular compuesto de células mononucleares y fibroblastos presenta un alto nivel de expresión de metaloproteinasa (MMP) de matriz celular, en AR destacan la MMP-1, 3, 9, 10 y 13. (McCachren *et al.*, 1990 y Aryeh *et al.*, 2006). En fase más avanzada de la enfermedad, el *pannus* celular es reemplazado, totalmente, por un tejido fibroso minimamente vascularizado (Kobayashi y Zif, 1975).

2.2. ANGIOGENESIS

La angiogénesis es un complejo mecanismo, mediante el cual se forman nuevos capilares a partir de vasos pre-existentes (Colville-Nash y Scout, 1992). Estos neovasos son estructural y funcionalmente anormales, su estructura es altamente desorganizada, los vasos son tortuosos y dilatados, de diámetros desiguales y excesivas ramificaciones. En cuanto a su ultraestructura, las paredes de estos vasos presentan un endotelio fenestrado, presentando numerosas aberturas o poros transcelulares, por lo tanto, una discontinua o ausente membrana basal, distanciándose así las uniones inter-endoteliales (Carmelett y Rakesh, 2000).

Las etapas implicadas en la formación del nuevo vaso son: migración de células murales (pericitos), desestabilización endotelial, la membrana basal y matriz extracelular son degradadas y removidas por proteasas específicas como las metaloproteinasas, Posteriormente, síntesis de nueva matriz extracelular, migración y proliferación de células endoteliales y por ultimo formación del nuevo vaso sanguíneo (Papetti y Hernan, 2002).

Procesos normales de angiogénesis ocurren durante la etapa embrionaria, cuando se establece el árbol vascular primario que permitirá el adecuado crecimiento y desarrollo de los órganos. En la etapa adulta es normal que se produzca en procesos fisiológicos como el ciclo femenino ovárico y en la reparación de heridas (Papetti y Hernan, 2002). Sin embargo, en otras circunstancias, la angiogénesis es dañina para el organismo, ya que contribuye al desarrollo de la ceguera en retinopatías diabéticas y facilita el crecimiento y metástasis de tumores. En artritis reumatoide, el incremento de angiogénesis a nivel de la membrana sinovial contribuye a la patogénesis de la

sinovitis, desarrollo del *pannus* sinovial y la consecuente destrucción del hueso y cartílago articular (Walsh, 1999).

2.2.1. Angiogénesis en artritis reumatoide:

Los linfocitos, macrófagos activados y fibroblastos sinoviales, pueden activar la angiogénesis; esto explica el aumento en la vascularización observada en la membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoidea (MacNaul *et al.*, 1990). La sinovia artrítica se convierte en un ambiente hipóxico, el cual es una potente señal para la formación de nuevos vasos sanguíneos. Es así, como en respuesta a esta disminución de la presión parcial de oxígeno celular, se expresa un inductor de angiogénesis, el factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1), el cual va a activar la producción por parte de los fibroblastos, de un importante factor angiogénico, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El VEGF es un potente mitógeno para las células endoteliales, produce aumento de la permeabilidad vascular y estimula la migración y proliferación de las células endoteliales. Ejerce su acción a través de dos receptores del tipo tirosina quinasa, el VEGF-R1, que estimula la formación de conductos capilares, y el VEGF-R2, que induce proliferación de células endoteliales (Paleolog, 2002). No sólo el HIF-1 puede estimular su producción, sino que también, y de una forma más marcada, es producido en respuesta a citoquinas inflamatorias como IL-1 y TNF α y también, factores de crecimiento, como factor de crecimiento transformante α y β (TGF- α , TGF- β) y, factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF-2) (Cotran *et al.*, 2000).

Otros inductores relevantes de angiogenesis en artritis reumatoidea son, quimioquinas como interleuquina 8 (IL-8), fractalquina, interleuquina 18 (IL-18), moléculas solubles de adhesión como E-selectina, y VCAM-1, glucoconjugados como lo son el antígeno soluble 4A11 y antígeno soluble CD146 (Koch, 2003).

Otro sistema que participa en la neoformación de vasos es el sistema angiopoiteína-Tie, que al contrario del VEGF, no induce mitosis de células endoteliales ni formación del vaso sanguíneo, si no que su acción es permitir el ensamblaje de los componentes no endoteliales del vaso sanguíneo, como las células musculares que forman parte del tubo vascular. En artritis reumatoide un estímulo para inducir la expresión de angiopoiteína 1 a nivel de los fibroblastos sinoviales es el TNF α (Koch, 2003).

En consecuencia, es esta proliferación de vasos sanguíneos la que provee oxígeno y nutrientes a la sinovia hipertrófica, además, es el medio de reclutamiento de células inflamatorias en la articulación, lo que permite la perpetuación del proceso (Lee y Weinblatt, 2001).

2.2.2. Marcadores de angiogenesis:

La formación de un nuevo microvaso requiere de una serie de interacciones, las que se realizan de manera específica y coordinada en el tiempo. Estos eventos de adhesión son mediados por moléculas de adhesión celular y moléculas de matriz extracelular, las que proveen de instrucciones a las células endoteliales para que migren al espacio perivascular y ensamblen un nuevo vaso junto con rodearse de pericitos (Bischoff, 1997).

Este tipo de moléculas son las que se ocupan en la actualidad para marcar angiogénesis. Dentro de las cuales se encuentran moléculas de la familia de las integrinas, las que participan en procesos de migración de células endoteliales y formación del vaso sanguíneo (Luscinkas y Lawler, 1994). En este grupo destacan $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$, las que tienen una alta expresión en los capilares sinoviales de pacientes con artritis reumatoidea (Paleolog *et al.*, 1998). En otro grupo se encuentran las del tipo cadherinas, como la cadherina vascular endotelial (VE cadherina) (Breier *et al.*, 1996), E-selectina y molécula soluble de adhesión vascular celular (VCAM-1 o CD31) (Koch *et al.*, 1995).

Otros marcadores son el VEGF (Hiroito *et al.*, 2001), y el factor de von willenbrand (FvW), que es producido por las células endoteliales y megacariocitos. La expresión del gen de este factor se encuentra en tejidos específicos, entre ellos el endotelial (Denis, 2002). El FvW funciona como medio de adhesión entre las plaquetas y la matriz extracelular (Zusuki *et al.*, 1997).

2.3 APOPTOSIS

La apoptosis celular, en la mayoría de los casos es un proceso fisiológico, controlado genéticamente, en el que determinadas células dirigen su propia muerte en beneficio del organismo. Todas las células del organismo están programadas para destruirse por apoptosis, ya sea porque hubiesen realizado por completo sus funciones, porque hayan sufrido un daño en su material genético o porque les falten las señales que las mantengan en plena actividad funcional (Rich *et al.*, 1999).

Existen dos vías para activar apoptosis, la “vía intrínseca” o mitocondrial, que comienza con la activación de proteínas como Bax y Bad,

por parte del gen de supresión tumoral o p53, el que se activa en respuesta a un daño en el ADN. El resultado de una función anormal de este gen, puede resultar en el desarrollo de neoplasia maligna (San Miguel *et al.*, 2006). La “vía extrínseca” es mediada por receptores, entre los que destacan el receptor para TNF, el receptor Fas y los receptores de glutamato, todos los cuales activan dominios de muertes como FADD (Fas Associated protein with Death Domain) y TRADD (TNFR-associated death domain), los que producirán la activación de las capas 8 y 10 (San Miguel *et al.*, 2006). Éstas llevarán a la activación de las endonucleasas que, finalmente van a producir la fragmentación de la cromatina nuclear y rotura del citoesqueleto (Cotran *et al.*, 2000).

2.3.1. Apoptosis en artritis reumatoidea:

La razón de hiperplasia sinovial, un cambio característico en artritis reumatoide aún no está clara del todo, a simple vista el crecimiento del tejido es producto de un desbalance entre la proliferación y muerte celular. Se sugiere que la apoptosis se encuentra disminuida en el tejido sinovial artrítico, lo que en conjunto con la proliferación celular da origen a la hiperplasia sinovial (Mountz *et al.*, 1994).

Una de las citoquinas que tienen gran protagonismo en artritis reumatoide es el TNF α , el cual induce apoptosis al unirse a su receptor 1 (TNFR1), el que presenta una alta expresión local (Deleuran *et al.*, 1992). Adicionalmente el ligando Fas (FasL), que es expresado en macrófagos, es capaz de inducir apoptosis al unirse a su receptor, el que es expresado en macrófagos, linfocitos y fibroblastos sinoviales (Cantwell *et al.*, 1992). Bajo ciertas condiciones el TNFR1 puede activar la caspasa 8 y producir apoptosis

a través de mecanismos que involucran las proteínas TRADD y FADD (Hsu *et al.*, 1995), sin embargo, a nivel de fibroblastos y macrófagos sinoviales el TNF α puede aumentar la expresión de ARNm para FLIP (FLICE-inhibitory protein). El FLIP es una molécula capaz de interactuar con la caspasa 8 y FADD, inhibiendo la activación de la caspasa 8, y por tanto la apoptosis (Bai *et al.*, 2004).

Por otra parte, en una inflamación crónica como en la artritis reumatoide, existe un ambiente con un alto nivel de radicales oxígeno y nitrógeno, lo que puede resultar en un daño a nivel del DNA, con una desregulación del factor de transcripción nuclear NF- κ B y el gen de supresión tumoral p53, quienes se encuentran implicados en la agresiva proliferación de los fibroblastos sinoviales (Asahara *et al.*, 1997). Experimentos en los cuales se ha realizado la inhibición del gen p53 a nivel de fibroblastos sinoviales, ha resultado en la presencia de velocidad de crecimiento independiente, por parte de estas células y una dispar en apoptosis (Davis, 2003).

2.3.2 Detección de apoptosis:

Existen distintas maneras para detectar apoptosis. Uno de los parámetros a considerar es observar los cambios morfológicos que experimenta la célula durante el proceso de apoptosis, como son pérdida de uniones celulares, cambio en la presencia de estructuras especializadas (microvellosidades, alteraciones mitocondriales o del retículo endoplásmico), cambio en la organización de la membrana citoplasmática, y la aparición de condensación de la cromatina o la aparición de cuerpos apoptóticos, que son fragmentos celulares que se desprenden durante el proceso de muerte. (Alfaro *et al.*, 2000). También detectando la degradación de DNA, que en el caso de la

apoptosis, ocurre de manera específica, ya que las endonucleasas que cortan el ADN, liberan nucleosomas que contienen entre 180 a 200 pares de bases nitrogenadas. Para esto, el método más utilizado es la extracción de DNA con fenol/cloroformo y su precipitación con etanol. En este caso, se realiza un corrimiento electroforético de los extractos de ADN, se podrá observar la aparición de un patrón característico de ADN en escalera (Martin *et al.*, 1990). La degradación también se puede medir detectando las proteínas histónicas presentes en los nucleosomas, con el método de ELISA (Holian., *et al* 1998) y moléculas que gatillan el proceso de apoptosis como la caspasa 3 (Benjamín., *et al* 1998).

Sin embargo uno de los métodos más usados para detectar apoptosis es el método de TUNEL (terminal transference mediated dUTP-biotin nick end labelling), donde los fragmentos de ADN los quiebres en las hebras de ADN son detectados por un marcaje enzimático en el extremo libre 3-OH con nucleótidos modificados, así se puede distinguir la muerte celular de necrosis, ya que esta última no presente el patrón de degradación internucleosomal (Alfaro., *et al* 2000).

2.4 Diferencias entre necrosis y apoptosis:

La apoptosis es un mecanismo fisiológico de muerte celular diferente morfológica y bioquímicamente de la necrosis (Ghidotti., *et al* 1995).

La apoptosis está programada genéticamente en respuesta a estímulos fisiológicos o condiciones subletales, mantiene la integridad de la membrana, ocurre disminución del tamaño celular, preserva la integridad de los orgánulos, presenta una temprana condensación de la cromatina y fragmentación del ADN en puntos muy concretos dando lugar a fragmentos oligonucleosomales que son de un tamaño muy regular. La célula se fragmenta en cuerpos apoptóticos rodeados por membrana que son reconocidos y fagocitados evitando la inflamación (Green., *et al* 1996).

Por el contrario, la necrosis es accidental o provocada por agentes letales (hipertermia, hipoxia, etc), existe pérdida de la integridad de la membrana, hay entrada de agua, aumento del tamaño celular y activación de fosfolipasas con rotura de la membrana de los orgánulos, la condensación de la cromatina ocurre de manera tardía y la fragmentación del ADN en fragmentos grandes y de tamaño irregular. La célula libera los contenidos de los lisosomas y los restos celulares inducen inflamación local (Ghidotti., *et al* 1995).

Para comprender los mecanismos celulares involucrados en la artritis reumatoide, se han utilizado una gran variedad de enfoques experimentales, en la mayoría de los casos se ha empleado el modelo murino de artritis inducida por colágeno tipo II (CIA), el cual es muy similar a la AR. Este modelo se caracteriza por la inflamación de múltiples articulaciones, acompañada de hiperplasia sinovial. . La CIA es gatillada mediante la inmunización de ratones,

genéticamente susceptibles, con colágeno tipo II bovino (Courtenay *et al*, 1980).

En éste trabajo de investigación se estudiaron los procesos de angiogénesis y apoptosis a nivel articular, en relación al desarrollo de las lesiones histopatológicas que ocurren en esta enfermedad, a los 14, 28, 42, 56 y 70 días p.d.i, y cuyos daños se relacionarán con los cambios clínicos observados.

Los resultados podrán servir como punto de referencia para futuras investigaciones que tengan como base la aplicación de posibles terapias enfocadas a combatir la apoptosis y la formación de estos nuevos vasos, ya que se acepta que estos eventos son cruciales en el progreso y mantención de la enfermedad.

3. HIPÓTESIS

La inducción de artritis murina con colágeno bovino tipo II (CIA), produce aumento de la actividad angiogénica y de la apoptosis celular a nivel del cartílago articular, en relación proporcional a la evolución de las lesiones propias del curso de la enfermedad.

4. OBJETIVO GENERAL

Describir el desarrollo de lesiones a nivel macroscópico e histopatológico a nivel articular durante la evolución de CIA y su relación con fenómenos de angiogénesis y apoptosis.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir los cambios histopatológicos a nivel de las articulaciones en ratones inducidos con CIA en los distintos días de tratamientos y relacionarlos con los cambios macroscópicos clasificados según grados de severidad.
2. Evaluar el desarrollo de angiogénesis en la membrana sinovial a través de la detección del factor de Von Willenbrand a nivel endotelial en los distintos días de tratamiento.
3. Evaluar en las distintas fases del tratamientos la apoptosis a nivel del cartílago articular a través de detección de fragmentación de ADN.
4. Correlacionar los valores de apoptosis y angiogénesis con los parámetros macroscópicos indicadores de severidad dentro de cada día de tratamiento.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. Animales:

Se usó ratones de la cepa DBA1/lacJ (H2^g) procedentes de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA). Los animales fueron mantenidos en el Bioterio Central del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

6.2. Inducción de artritis con colágeno bovino tipo II (CIA):

Se inoculó colágeno bovino tipo II (Chondrex, Redmond, WA, USA) vía subcutánea en la base de la cola de ratones genéticamente susceptibles DBA1/lacJ (H2^g), siguiendo el protocolo previamente descrito por Courtenay *et al* (1980).

6.3. Muestras:

1. Se sacrificaron mediante dislocación cervical posterior a anestesia con eter 6 ratones a los 14, 28, 42, 56 y 70 días post inoculación con colágeno y se obtuvieron muestras, para histopatología e inmunohistoquímica, de tejido articular correspondiente a la extremidad que presentó el mayor puntaje de *índice artrítico* (IA). Paralelamente se sacrificaron en cada fecha 3 ratones controles inoculados con solución salina.

Las mediciones se realizaron a nivel de cada articulación de la extremidad elegida, vale decir: articulaciones interfalángicas distal (IFD), interfalángicas proximal (IFP), metacarpo o metatarso falángicas (MC-F ó MT-F), intercarpales o intertarsales (IC ó IT).

2. El índice artrítico para cada una de las extremidades se calculó de acuerdo a lo descrito por Yuasa, *et al* (1999), el que define una escala con rangos de 0-4 cuya lectura es la siguiente:

- 0 = Ratón normal.
- 1 = Eritema articular.
- 2 = Hinchazón con edema y eritema.
- 3 = Edema severo y eritema desde articulación a pliegues interdigitales.
- 4 = Edema y deformación máxima, con anquilosis.

El IA total de cada animal corresponde a la sumatoria de los puntajes obtenidos en cada una de las manos y patas, con un máximo de 16 puntos.

3. Todas las muestras fueron fijadas por 24 horas en formalina al 10%. Luego descalcificadas en EDTA al 10% por 6 semanas (aproximadamente). Posteriormente, fueron deshidratadas en alcoholes y aclarados en Xilol en un procesador automático de tejidos (Shandon, Citadel 2000, EEUU). Las muestras se incluyeron en parafina y se cortaron en un micrótopo de rotación (Wetzlar, EEUU) a 4 μ de grosor. Los cortes para técnica de Hematoxilina y Eosina (HE) fueron montados sobre portaobjetos albuminados (Lopez *et al*, 1982) y los cortes para inmunohistoquímica sobre portaobjetos cuyo protocolo se muestra en el Anexo1. Posteriormente, se desparafinaron y rehidrataron para aplicar los métodos seleccionados.

6.4. Análisis histopatológico:

En aquellas muestras teñidas con HE, se realizó un análisis descriptivo general de la membrana sinovial y del cartílago articular, en los distintos días del tratamiento. Además, se realizaron las siguientes mediciones:

6.4.1. Índice de densidad celular en membrana sinovial (IDCMS):

A nivel de cada articulación seleccionada se digitalizaron las imágenes correspondientes a membrana sinovial en un aumento 100x. Se calculó por morfometría un *índice de densidad celular* (%), el que corresponde a:

$$\text{IDCMS} = \frac{\text{Área total de membrana sinovial}}{\text{Área total de núcleos celulares}} \times 100$$

6.4.2. Puntaje de daño histopatológico a nivel de cartílago articular:

Se estableció un puntaje de daño histopatológico a nivel del cartílago articular, según el método descrito por Jou *et al.*; (2005), el que contempla los siguientes parámetros:

0 = Cartílago normal.

1 = Leve destrucción, con un foco de pérdida de condrocitos.

2 = Moderada destrucción, con múltiples focos de pérdida de condrocitos.

3 = Severa o destrucción total, pérdida total de condrocitos.

6.4.3. Grado de fibrosis:

La severidad de la fibrosis se diagnosticó según el número de capas de colágeno y el número promedio de focos de fibrosis, en 5 campos diferentes y se clasificó como:

0 = Normal.

1 = Leve (1-3 capas de fibrosis; < 2 focos).

2 = Moderada (4-10 capas de fibrosis; 3-5 focos).

3 = Severa (> 10 capas de fibrosis; > 5 focos).

6.5. Técnicas inmunohistoquímica:

6.5.1. Inmunotinción para angiogénesis:

La vascularidad fue detectada mediante el uso de un anticuerpo policlonal de conejo anti factor de von Willenbrand (FvW) (Dako, USA).

Luego se empleó un anticuerpo secundario biotinilado anti IgE de conejo (Dako, USA). Posteriormente, se usó el conjugado estreptovidina/peroxidasa como amplificador de la reacción (Dako, USA). Esta reacción enzimática fue revelada con diaminobenzidina (Dako, USA) como sustrato cromógeno. Se consideró como inmunotinción positiva la presencia de un color café intenso en células endoteliales (Protocolo en Anexo 2).

En cada extremidad seleccionada, a nivel de la membrana sinovial se se midieron morfométricamente las áreas inmunomarcadas las que se expresaron en μm^2 . Para cada ratón se obtuvo el promedio de $\mu\text{m}^2/\text{campo}$.

Además, mediante análisis morfométrico se calculó el lecho vascular que corresponde al área ocupada por vasos sanguíneos funcionales (VSF) que corresponden a aquellos que presentaron lumen expandido con o sin eritrocitos en su interior. El resultado se expresó como el índice del área de lecho vascular (IALV):

$$\text{IALV} = \frac{\text{Área de MS}}{\text{VSF}} \times 100$$

El resultado para cada ratón fue el promedio de los índices en cada campo.

6.5.2. Inmunotinción para apoptosis:

Para este estudio se utilizó el método de “TUNEL”, para lo cual se aplicó el *kit* “*ApopTag®Plus peroxidase in situ apoptosis detection kit*” (Chemicon, USA), que reconoce fragmentos de ADN.

El protocolo del método utilizado se muestra en el Anexo 3. El cual consiste brevemente en:

Primero: marcar los extremos libres 3'OH de los nucleótidos con digoxigenina, mediante la enzima TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferasa).

Segundo: aplicar anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa.

Tercero: revelar la reacción enzimática con diaminobenzidina la que proporciona un color café.

Se realizaron mediciones morfométricas a nivel del cartílago articular, (CA) para obtener el área inmunomarcada. Se calculó el índice apoptótico (IAp), según la siguiente fórmula:

$$\mathbf{IAp} = \frac{\mathbf{\text{Área condrocitos total}}}{\mathbf{\text{Área de condrocitos apoptóticas}}} \times 100$$

Los resultados para cada ratón se entregaron como un promedio de los índices por campo.

6.6. Digitalización de imágenes:

Para calcular los resultados de las áreas inmunomarcadas en ambas técnicas utilizadas, se digitalizaron las imágenes correspondientes a 5 campos tomados al azar, con un aumento 200x, a una resolución de 512 X 480 pixeles, mediante una videocámara digital (Cool Snap-Pro CF, Media Cybernetic, USA) montada en un microscopio óptico científico (Nikon Eclipse E-600) y conectada a una computadora con un software morfométricos (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, USA). Las lecturas de las áreas seleccionadas se expresaron como se explicó, anteriormente, en cada método inmunohistoquímico.

6.7. Análisis estadístico:

Los valores obtenidos en las distintas fases de CIA, tanto para el estudio histopatológico, angiogénesis y apoptosis se analizaron mediante el empleo de un “análisis de varianza en diseño factorial 2x5” (ANDEVA). Donde los dos factores a evaluar fueron:

1. Factor inducción de la enfermedad: Con dos niveles (CIA = animales inducidos con artritis; Controles = animales sin inducción de artritis).
2. Factor tiempo: Con cinco niveles (14, 28, 42, 56 y 70 días post inducción de CIA).

Las variables que mostraron diferencias con un efecto significativo ($p < 0.05$) fueron comparadas con el test de rangos múltiples de Tukey (Steel y Torrie, 1980).

Además, se realizaron mediciones para comparar el nivel de significancia entre los grupos CIA y control en cada fecha, para esto se realizó la prueba de Sheffé.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico SAS (2000).

7. RESULTADOS

7.1. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Al transcurrir los días de tratamiento, se pudo observar, a nivel de la membrana sinovial, una infiltración progresiva de células inflamatorias, del tipo neutrófilos, linfocitos y macrófagos, lo que junto al aumento de proliferación de las células sinoviales, principalmente fibroblastos, dieron por resultado el aumento de grosor. A medida que la enfermedad se hizo crónica, otros componentes se fueron agregando, como la formación de tejido fibrótico y proliferación de vasos sanguíneos, tejido que en conjunto se conoce como *pannus* sinovial.

En la Figura 1A se aprecia el aspecto de una articulación control donde se aprecia la integridad y grosor normal de la membrana sinovial y cartílago articular. A los 14 d.p.i. (Figura 1B) no se observan diferencias con el control. Sin embargo, a los 28 d.p.i. aparecen los primeros leucocitos, principalmente, PMN neutrófilos en membrana sinovial (Figura 1C). A los 42 d.p.i. se produce un considerable aumento celular a nivel de la membrana sinovial y se comienza a formar el *pannus* (Figura 1D). A los 56 d.p.i., el *pannus* invade el cartílago articular, el que presenta un grado apreciable de destrucción (Figura 1E), y a los 70 d.p.i. el *pannus* ya ha destruido por completo el cartílago articular (Figura 1F).

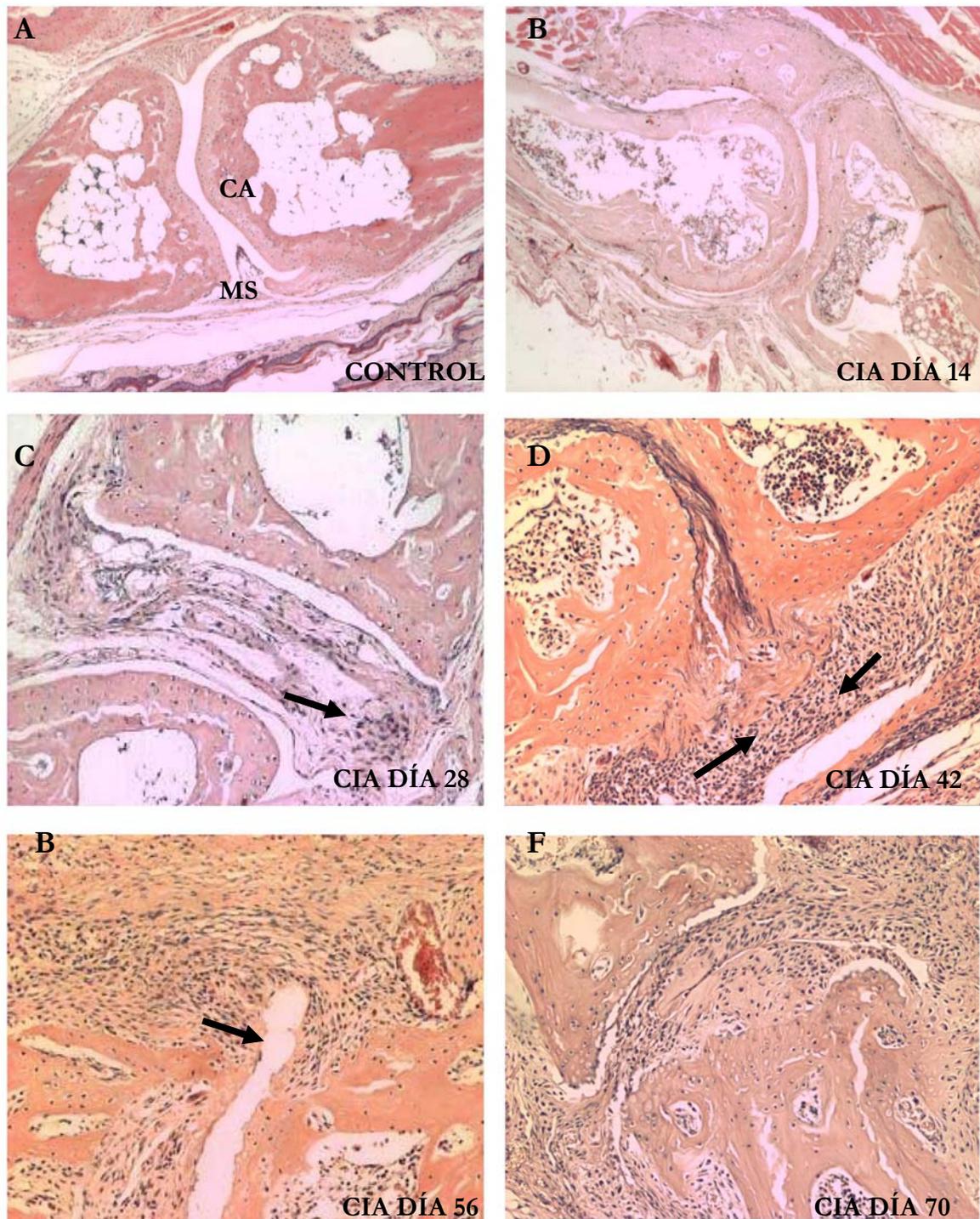


FIGURA 1: Fotografía de articulación interfalángica proximal en ratones con artritis inducida por colágeno bovino tipo II (B-F) y controles (A). **A:** Ratón control (40X); **B:** 14 días post inoculación de colágeno (d.p.i.) (40X), no hay lesiones aparentes, y aún la membrana sinovial y el cartílago articular (CA) se encuentran intactos. **C:** 28 d.p.i.; leucocitos (flecha) en membrana sinovial (100x) **D:** 42 d.p.i. considerable aumento celular a nivel de la membrana sinovial y formación del *pannus* celular (flecha) (40x). **E:** 56 d.p.i. el *pannus* comienza a invadir el CA, el que ya se nota con un grado de destrucción (100x). **F:** 70 d.p.i. el *pannus* y destrucción de CA (100x).

7.2. ÍNDICE ARTRÍTICO (IA)

En la Tabla N° 1 y Gráfico N°1 se muestran los valores obtenidos de índice artrítico (IA) para los días 14, 28, 42, 56 y 70 post inducción de CIA y controles; se puede observar, que el IA se incrementa a medida que transcurren los días post inoculación con colágeno bovino tipo II, aumentando significativamente ($p < 0,05$) los valores promedio, partir del día 28 p.d.i. con relación al control respectivo.

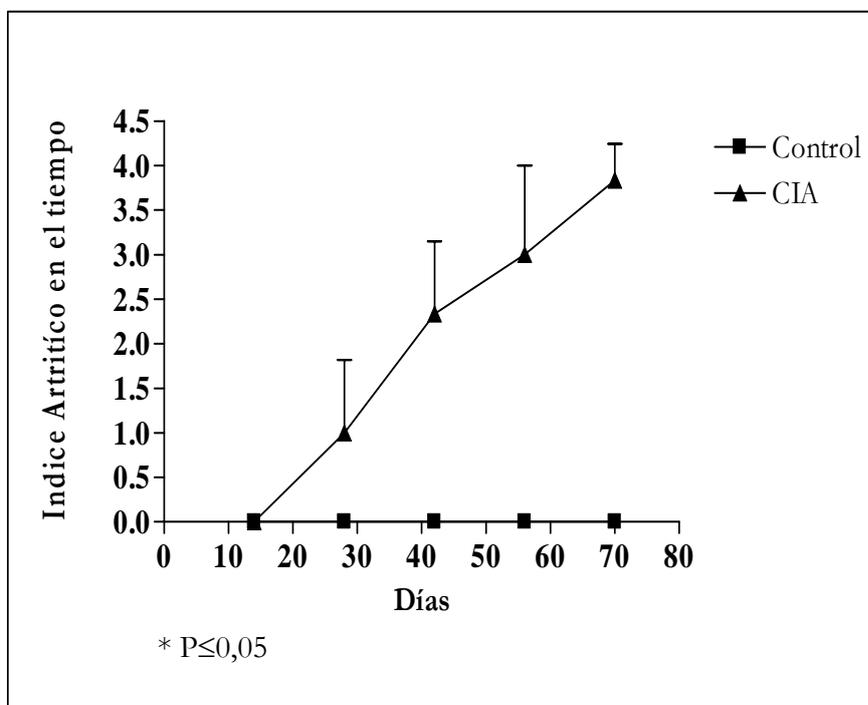
TABLA N°1:

Índice artrítico post inducción de artritis mediante inoculación de colágeno bovino tipo II en ratones dba1/lacj y animales controles inoculados con suero salino

DÍAS POST INDUCCIÓN	ÍNDICE ARTRÍTICO		COMPARACIÓN CIA Y CONTROLES
	CIA	CONTROL	
14	0	0	$P > 0,05$
28	$1,00 \pm 0,81$	0	$P \leq 0,05$
42	$2,33 \pm 0,81$	0	$P \leq 0,05$
56	$3,00 \pm 1,00$	0	$P \leq 0,05$
70	$3,83 \pm 0,40$	0	$P \leq 0,05$
PROMEDIO	$2,03 \pm 1,53$	0	

GRÁFICO N° 1

Índice artrítico (IA) pos inoculación con colágeno bovino tipo II y controles



Progresión del índice artrítico en el tiempo. CIA: Ratones DBA1/lacJ inoculados con colágeno bovino tipo II. Animales controles inoculados con suero salino

7.3. ÍNDICE DE DENSIDAD CELULAR EN MEMBRANA SINOVIAL (IDCms)

La Tabla N°2 muestra los valores promedios de IDCms para los días 14, 28, 42, 56 y 70 post inducción de CIA y controles; donde se puede apreciar que IDCms aumenta a medida que transcurre el tiempo de tratamiento, en cambio, los grupos controles permanecieron constantes (Gráfico N°2). El análisis estadístico mostró que, sólo a partir del día 42 hubo diferencias significativas con relación al control respectivo ($p < 0,05$). La

prueba de Tukey estableció que hubo diferencias significativas (subíndices distintos) entre los días 14 y 56 y los días 14 y 70 post inducción de la enfermedad ($p < 0,05$).

TABLA N° 2

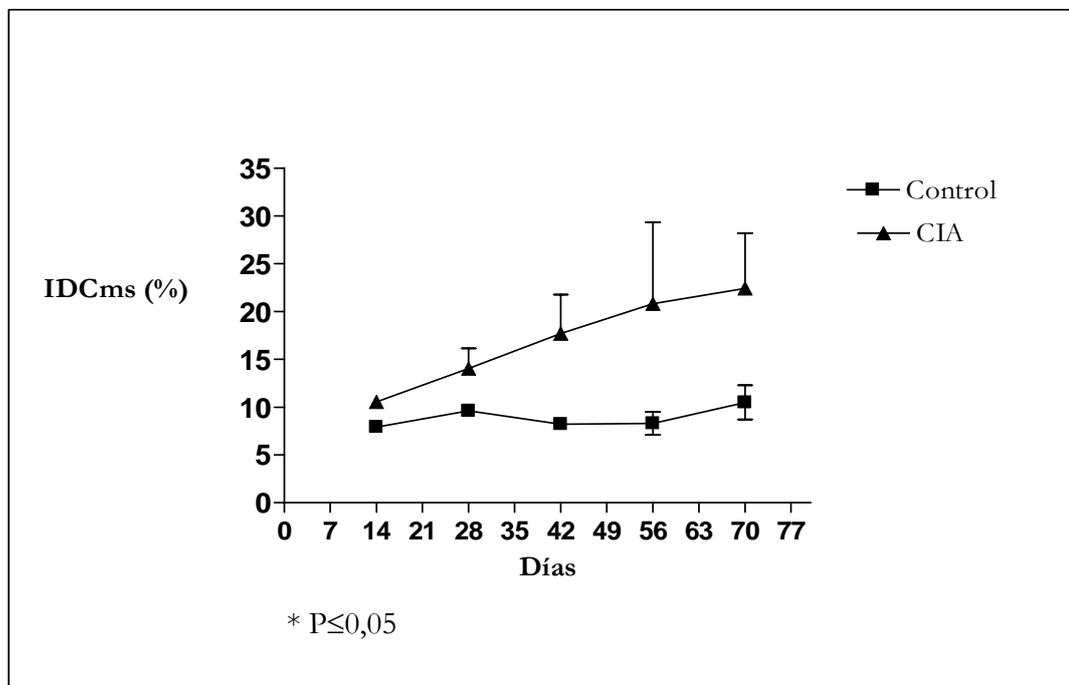
Índice de densidad celular en membrana sinovial (IDCms), en animales con artritis inducida (CIA) y controles (valores promedios)

DÍAS POST INDUCCION	ÍNDICE DE DENSIDAD CELULAR EN MEMBRANA SINOVIAL %±D.E.		COMPARACIÓN CIA Y CONTROLES
	CIA	CONTROL	
14	10,54 ± 0,52a	7,26 ± 1,11	P>0,05
28	13,32 ± 3,68ab	9,73 ± 0,27	P>0,05
42	18,34 ± 4,32ab	8,22 ± 0,57	P≤0,05
56	20,73 ± 8,49b	8,30 ± 1,19	P≤0,05
70	21,75 ± 6,84b	10,49 ± 1,79	P≤0,05
PROMEDIO	16,93 ± 4,83	8,80 ± 1,29	

* (Letras distintas distribuidas en forma vertical indican diferencias significativas entre días).

GRÁFICO N°2

Índice de densidad celular en membrana sinovial (IDCms) en el tiempo



7.4. PUNTAJE DE DAÑO HISTOPATOLÓGICO A NIVEL DE CARTÍLAGO ARTICULAR:

En el Gráfico N°3, se observa que el grado de destrucción a nivel del cartílago articular fue aumentando con los días, a diferencia del grupo control, que siempre tuvo valor 0. En la Tabla N°3, se pueden ver los promedios obtenidos para los distintos días. El análisis estadístico estableció que existen diferencias significativas ($p < 0,05$), dentro de cada día, a partir del día 42 entre los grupo CIA y control. La prueba de Tukey arrojó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el día 14 y los días 42, 56 y 70 y entre el día 28 y los días 42, 56 y 70 (subíndices distintos).

TABLA N°3

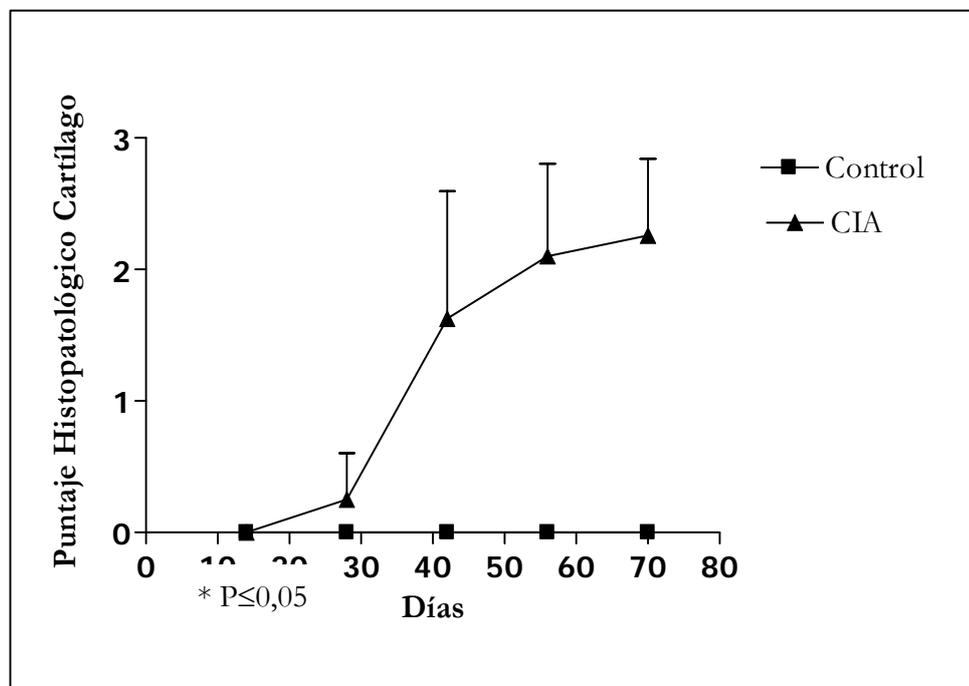
Valores promedios de puntaje de daño histopatológico a nivel de cartílago articular

DÍAS POST INDUCCIÓN	PUNTAJE DE DAÑO HISTOPATOLÓGICO DE DESTRUCCIÓN EN CARTÍLAGO ARTICULAR \pm D.E.		COMPARACIÓN CIA Y CONTROLES
	CIA	CONTROL	
14	0a	0	P<0,05
28	0,05 \pm 0,03a	0	P<0,05
42	1,63 \pm 0,96b	0	P \leq 0,05
56	1,75 \pm 1,06b	0	P \leq 0,05
70	2,26 \pm 0,58b	0	P \leq 0,05
PROMEDIO	1,22 \pm 0,94	0	

- (Letras distintas distribuidas en forma vertical indican diferencias significativas entre días)

GRÁFICO N°3

Progresión del puntaje histopatológico de destrucción de cartílago articular en el tiempo



7.5. FIBROSIS:

En el Gráfico N°4, se puede apreciar que el grado de fibrosis aumentó a medida que la enfermedad se hacía crónica, a diferencia de los grupos controles, que siempre se mantuvieron en el rango basal (valor 0).

La Tabla N° 4 muestra los valores promedios obtenidos en cada fecha, donde se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CIA y control ($p < 0,05$), a partir del día 42 d.p.i Para cada día, los promedios con subíndices distintos analizados con la prueba de Tukey arrojó como significativas las diferencias entre los días 14 y 56, 14 y 70, 28 y 56 y los días 28 y 70 ($p < 0,05$).

TABLA N°4

Valores promedios obtenidos en cada fecha para el grado de fibrosis

DÍAS POST INDUCCIÓN	GRADO DE FIBROSIS <i>ESCALA 0 a 3</i>		COMPARACIÓN CIA Y CONTROLES
	CIA	CONTROL	
14	0a	0	p>0,05
28	0a	0	p>0,05
42	*1,50 ± 1,05ab	0	P≤0,05
56	*2,17 ± 1,33b	0	P≤0,05
70	*2,33 ± 0,52b	0	P≤0,05
PROMEDIO	1,20 ± 1,13	0	

* (Letras distintas distribuidas en forma vertical indican diferencias significativas entre días).

GRÁFICO N°4

Valores promedios para el grado de fibrosis en el tiempo

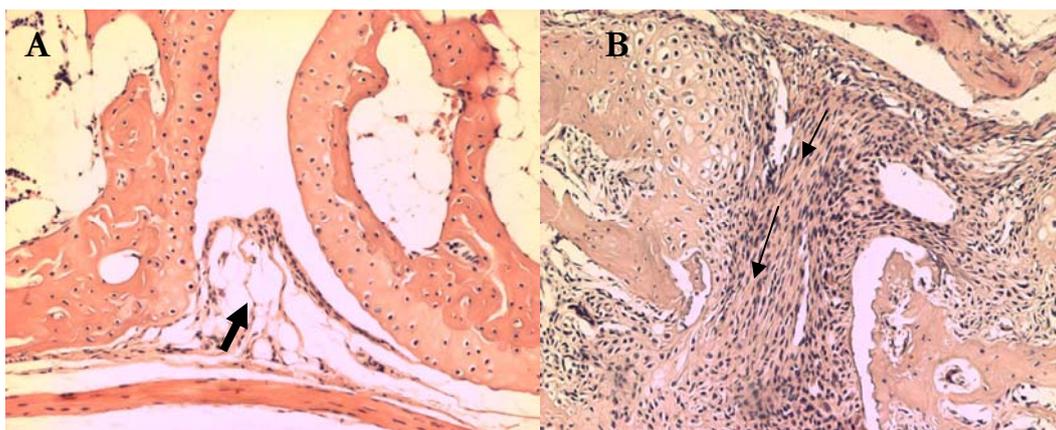
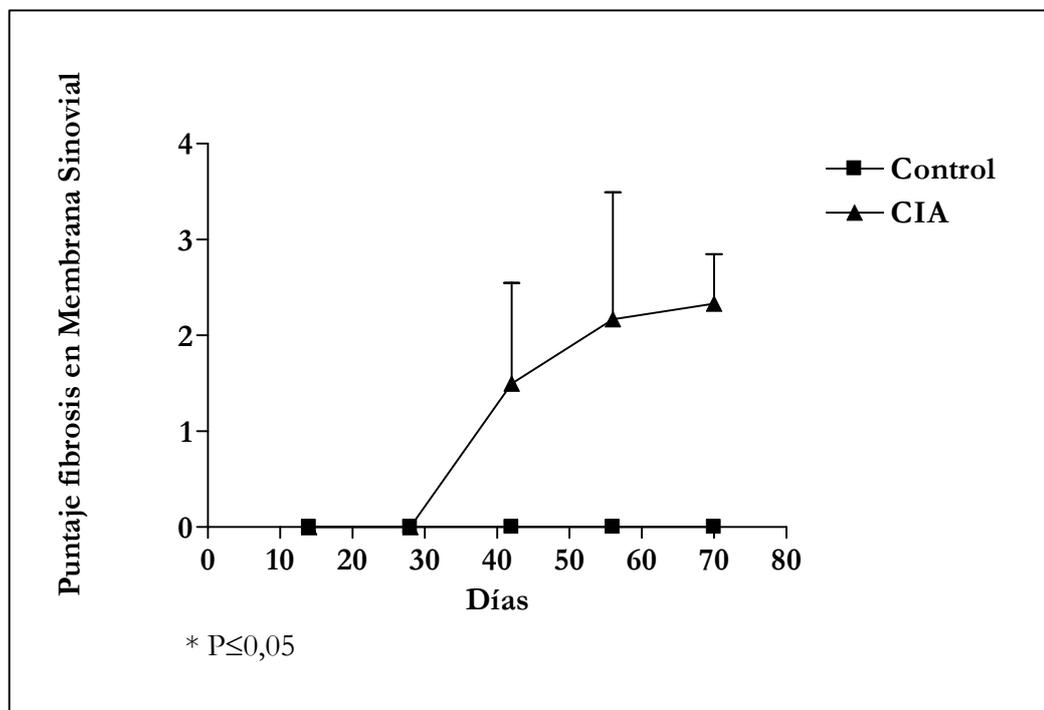


FIGURA N°2: Fotografía de articulación metacarpofalángica. **A:** Ratón control (100x), donde se aprecia una membrana sinovial normal con un grado de fibrosis = 0 (flecha); **B:** Membrana sinovial de ratón CIA a los 70d.p.i, (100x) con un grado de fibrosis = 3, donde se pueden apreciar las capas de colágeno (flechas) características de la fase crónica de la enfermedad.

7.6. INMUNOHISTOQUIMICA

7.6.1. Angiogénesis

7.6.1.1. Área inmunomarcada para factor endotelial de Von Willenbrand (FvW) en membrana sinovial:

La presencia de células endoteliales detectadas por inmunomarcación de FvW en membrana sinovial aumentó en los animales entre los días 14 y 70 d.p.i., a diferencia de los grupos controles que se mantuvieron constantes (Gráfico N°5). La inmunomarcación se detectó en endotelio de vasos funcionales de distinto calibre y en brotes angiogénicos (Figura N°2B).

La Tabla N°5 muestra los valores promedios de área inmunomarcada con el FvW, los que oscilaron entre $17,24 \pm 1,80 \mu\text{m}^2$ y $22,90 \pm 4,90 \mu\text{m}^2$ para los animales del grupo control. A nivel de los animales con CIA, a los 14, 28, 42, 56 y 70 d.p.i. presentaron un área inmunomarcada de $29,17 \pm 6,97 \mu\text{m}^2$, $53,01 \pm 12,32 \mu\text{m}^2$, $77,52 \pm 41,40 \mu\text{m}^2$, $91,03 \pm 45,97 \mu\text{m}^2$ y $144,54 \pm 37,91 \mu\text{m}^2$, respectivamente.

El análisis estadístico estableció diferencias significativas entre ambos grupos de animales CIA y control ($p < 0,05$). La prueba de Tukey mostró diferencias significativas (subíndices distintos) entre los días 14 y 70, 28 y 70, 42 y 70 ($p < 0,05$) en los ratones con artritis. En cuanto a los promedios de cada día de evaluación, a partir del día 28 los grupos CIA tuvieron diferencias significativas respecto de su control.

GRÁFICO N°5

Área (μm^2) de angiogénesis inmunomarcada (fvw) en membrana sinovial, durante el tratamiento

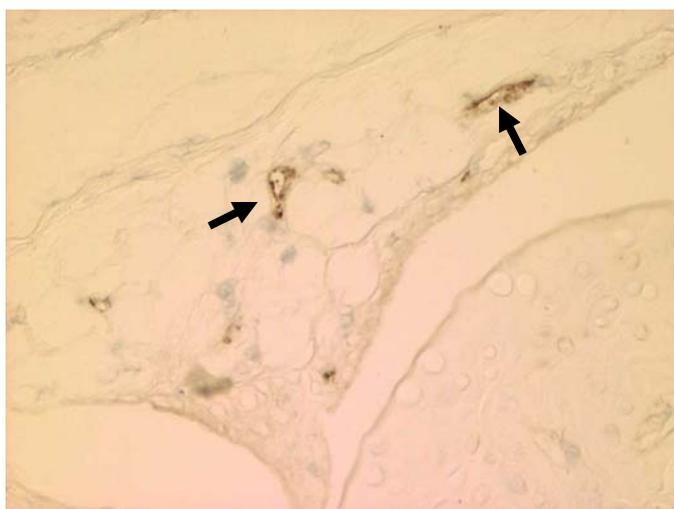
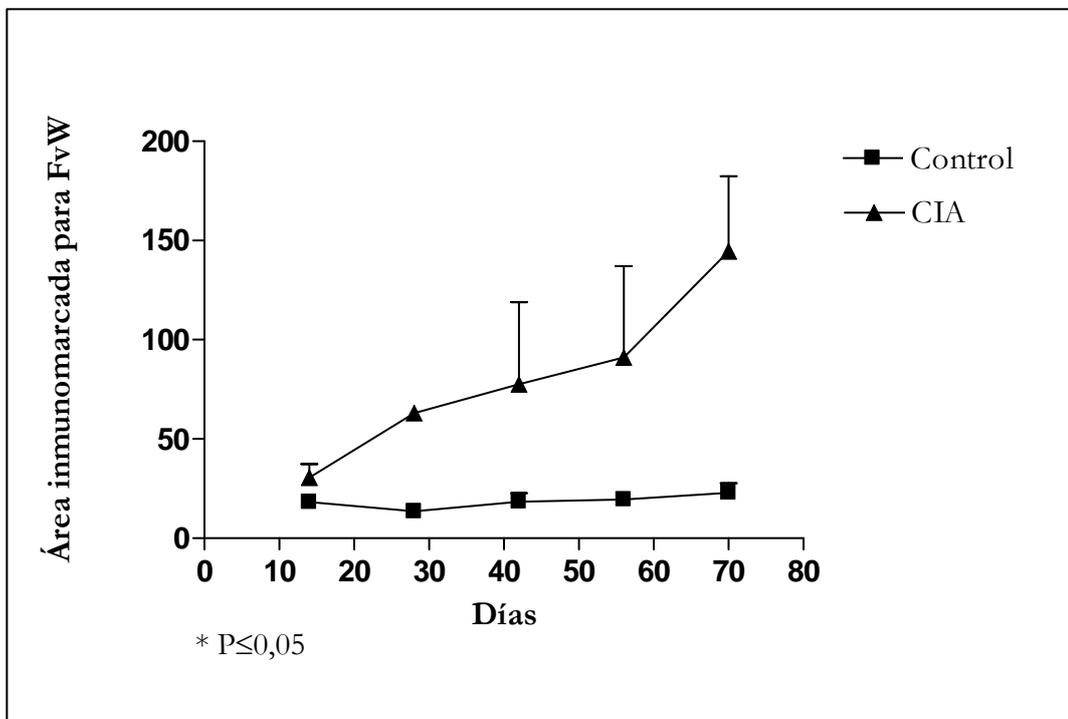


Figura N°3: Fotografía de membrana sinovial. **A:** Membrana sinovial en ratón control (200x) donde se aprecia la normal vascularidad de la membrana (flechas).

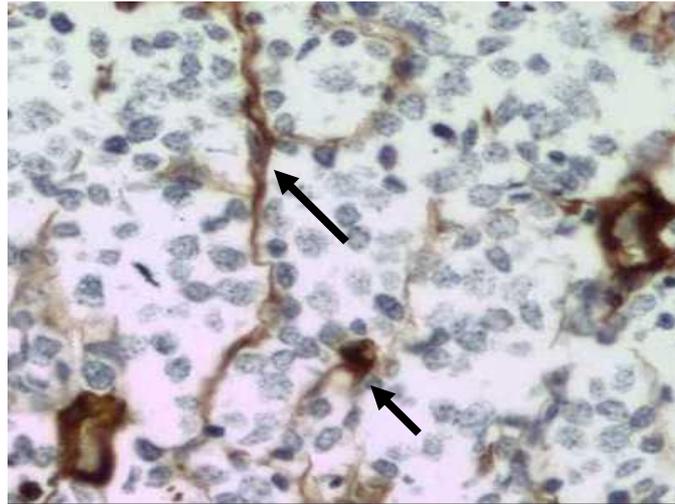


Figura N°4: Membrana sinovial de ratón CIA a los 28d.p.i (200x), donde se aprecian capilares sanguíneos y además la neoformación de brotes angiogénicos (flecha) que llevarán a la posterior formación de un vaso funcional.

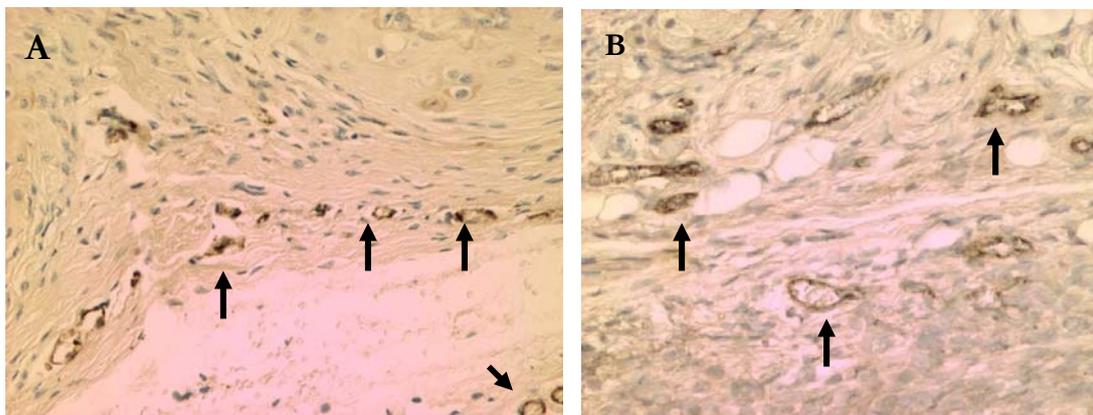


FIGURA N°5: Fotografía de membrana sinovial en ratones CIA a los 70 d.p.i. **A:** Fotografía 100x, donde se puede observar la mayor cantidad de capilares neoformados en lo que a esta fecha denominamos *pannus* (flechas). **B:** Fotografía 200x, donde se aprecian con mayor detalle los capilares funcionales de lumen expandido (flechas).

TABLA N°5

Área promedio (μm^2) inmunomarcada (FvW) en membrana sinovial de ratones CIA y controles

DÍAS POST INDUCCIÓN	ÁREA INMUNOMARCADA PARA FvW (μm^2)		COMPARACIÓN CIA Y CONTROLES
	CIA	CONTROL	
14	29,17 \pm 6,97a	17,24 \pm 1,80	p>0,05
28	53,01 \pm 2,32a	21,96 \pm 3,85	P \leq 0,05
42	77,52 \pm 41,40a	19,44 \pm 4,17	P \leq 0,05
56	91,03 \pm 45,97ab	19,66 \pm 1,78	P \leq 0,05
70	144,54 \pm 37,91b	22,90 \pm 4,90	P \leq 0,05
PROMEDIO	79,05 \pm 43,59	20,24 \pm 2,23	

* (Letras distintas distribuidas en forma vertical indican diferencias significativas entre días).

7.6.1.2. ÍNDICE DEL ÁREA DE LECHO VASCULAR (IALV):

Este índice, que corresponde al área del lecho vascular funcional en una la superficie determinada de membrana sinovial, se incrementó en el tiempo, a excepción del día 28 que registró una leve disminución con respecto al día 14 d.p.i (Gráfico N°6). En los grupos controles los valores fluctuaron entre 4,68 \pm 2,87% y 5,60 \pm 2,67%, independientemente del día observado. Los índices en los animales del grupo CIA, fueron 7,35 \pm 2,35%, 7,06 \pm 2,72%, 11,98 \pm 3,13%, 15,22 \pm 5,30% y 16,68 \pm 4,95%, a los 14, 28, 42, 56 y 70 d.p.i respectivamente (Tabla N°6). El análisis de varianza estableció que existían diferencias significativas entre los días 14 con 42, 56 y 70, y entre los días 28 con 42, 56 y 70 d.p.i (p>0,05). Además se encontraron diferencias (P \leq 0,05) entre CIA y controles a partir del día 42 postratamiento.

GRÁFICO N°6

Índice (%) de área de lecho vascular por área de membrana sinovial, en animales CIA y controles

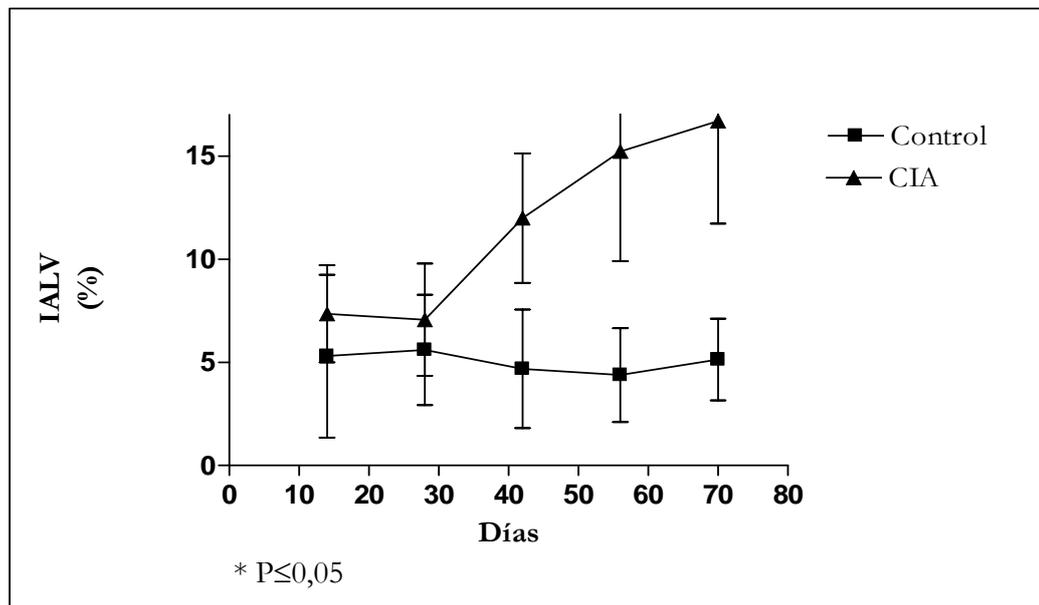


TABLA N°6

Índice (%) de área de lecho vascular por área de membrana sinovial, en animales CIA y controles

DÍAS POST INDUCCION	ÍNDICE (%)		COMPARACIÓN CIA Y CONTROLES
	CIA	CONTROL	
14	7,35 ± 2,35 a	5,30 ± 3,94	p > 0,05
28	7,06 ± 2,72 a	5,60 ± 2,67	p > 0,05
42	*11,98 ± 3,13b	4,68 ± 2,87	P ≤ 0,05
56	*15,22 ± 5,30b	4,38 ± 2,27	P ≤ 0,05
70	*16,68 ± 4,95 b	5,13 ± 1,97	P ≤ 0,05
PROMEDIO	11,66 ± 4,40	5,02 ± 0,48	

* (Letras distintas distribuidas en forma vertical indican diferencias significativas entre días)

7.6.1.3. Apoptosis en cartílago articular:

A nivel del cartílago articular, los condrocitos presentaron inmunoreactividad positiva a apoptosis, en núcleo y/o citoplasma (Figura N° 6), cuyo índice apoptótico (IAp), aumentó sostenidamente en animales CIA al avanzar los días de tratamiento a diferencia del grupo control que mantuvo los valores constantes (Gráfico N° 7).

Como se observa en la Tabla N°7, IAp para los ratones del grupo control varió entre $7,46 \pm 1,99\%$ y $9,62 \pm 1,63\%$, independiente del día, mientras que para los animales del grupo CIA, el índice aumentó en forma progresiva a partir del día 14 ($9,33 \pm 2,74\%$) hasta el día 70 ($28,30 \pm 1,25\%$).

En el análisis estadístico, las diferencias entre los días de tratamiento fueron significativas ($p < 0,05$) entre los días 14 y 42, 14 y 56, 14 y 70, 28 y 56, 28 y 70 y entre los días 42 y 70 (Tabla N°7).

Tabla 7

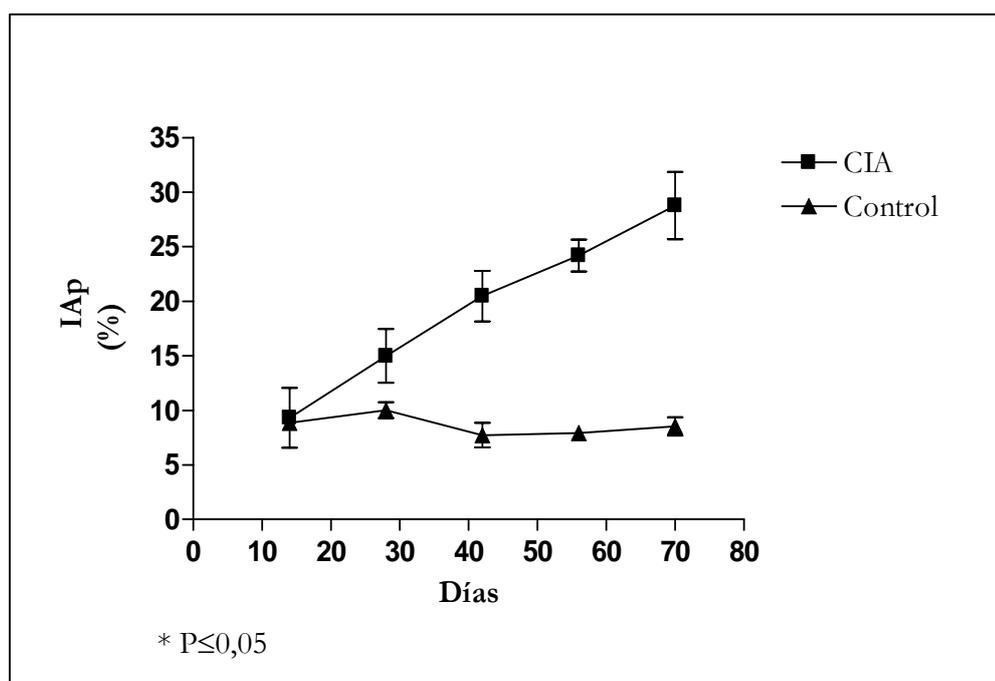
Índice apoptótico (IAp%) del cartílago articular

DÍAS POST INDUCCION	ÍNDICE APOPTÓTICO EN CARTÍLAGO /ÁREA NUCLEAR CELULAR TOTAL/ÁREA NUCLEAR APOPTÓTICA (%)		COMPARACIÓN CIA Y CONTROLES
	CIA	CONTROL	
14	9,33 ± 2,74a	8,85±0,95	p>0,05
28	14,99±2,46 ab	7,46±1,99	P≤0,05
42	20,48±2,33 bc	8,18±2,93	P≤0,05
56	24,20±1,48 cd	9,48±0,56	P≤0,05
70	28,30±1,25 d	9,62±1,63	P≤0,05
PROMEDIO	19,46±7,48	8,71±0,90	

* (Letras distintas distribuidas en forma vertical indican diferencias significativas entre días).

GRÁFICO N°7

Índice apoptótico (IAp%) del cartílago articular



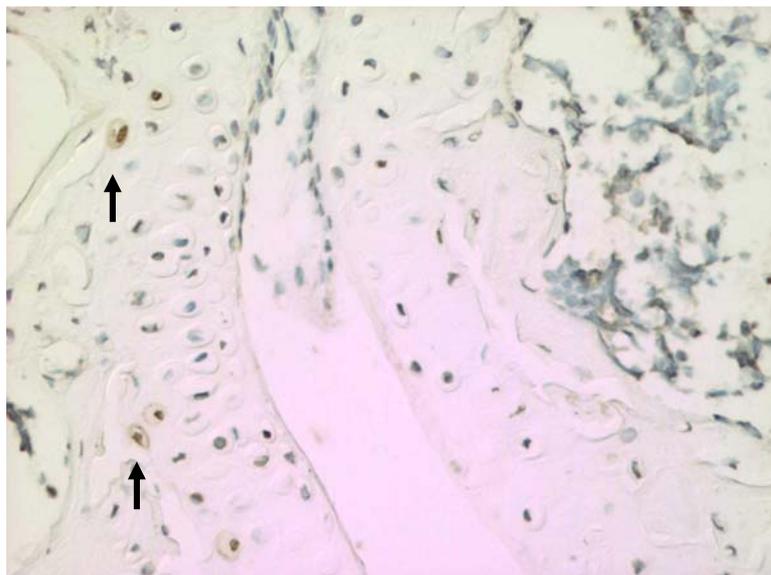


FIGURA N°6: Fotografía de cartílago articular en ratón control (200x), donde se puede apreciar el escaso porcentaje de condrocitos positivos para apoptosis (flechas).

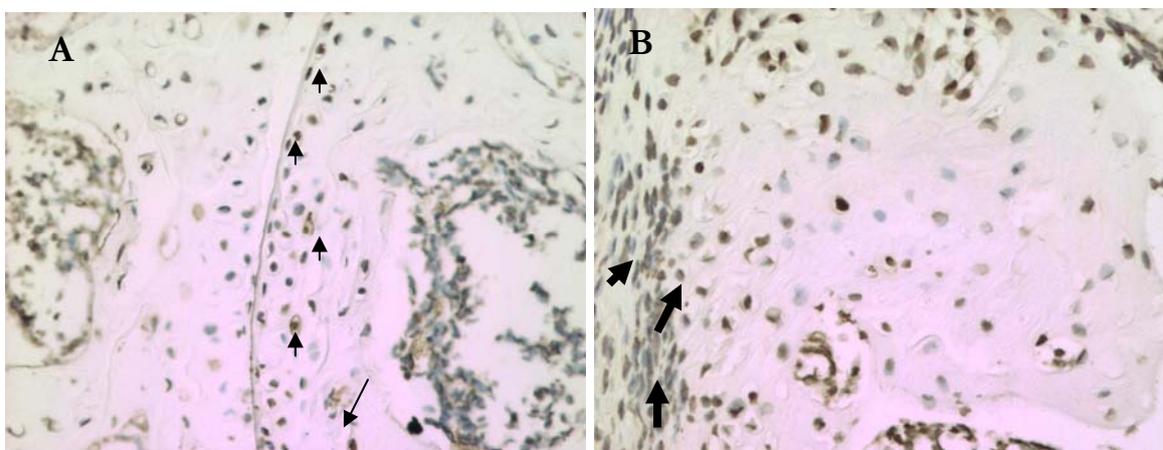


FIGURA N°7: Fotografía de cartílago articular. **A:** Ratón de 42 días (200x), se aprecia un mayor porcentaje de condrocitos con inmunoreacción positiva a apoptosis (flechas); **B:** Ratón de 70 días, donde se observa el *pannus* sinovial invadiendo el cartílago articular (flechas) y una alta proporción de condrocitos apoptóticos.

7.7. ANÁLISIS DE CORRELACION:

Al calcular el índice de correlación entre índice artrítico y valores de angiogénesis en membrana sinovial, se encontró una significativa correlación positiva ($r=0,95$; $p<0,05$), como se muestra en el Gráfico N°8.

En cuanto a IAp en el cartílago articular, resultó ser de $r=0,90$ ($p<0,05$), lo que establece que estas dos variables se encuentran altamente correlacionadas (Gráfico N°9).

GRÁFICO N°8

Correlación entre la angiogénesis en membrana sinovial e índice artrítico

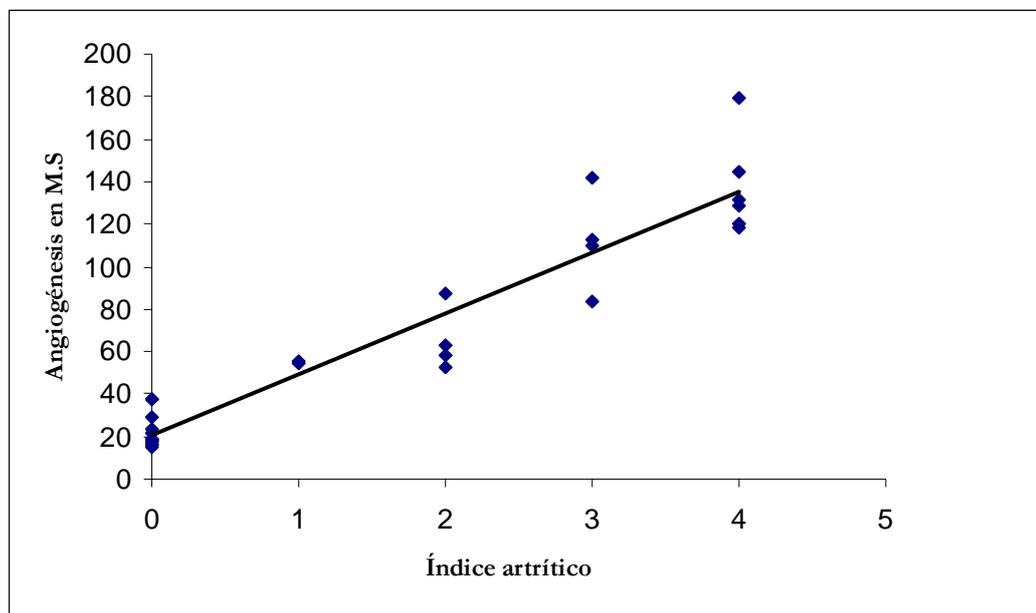
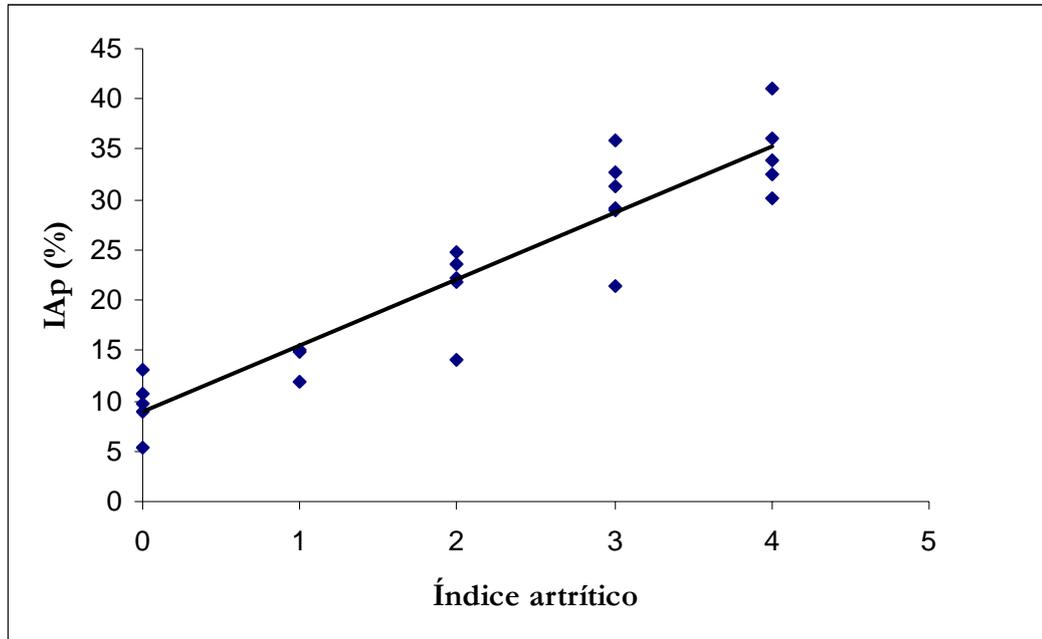


GRÁFICO N°9

Correlación entre apoptosis en condrocitos e índice artrítico



8. DISCUSIÓN

El análisis histopatológico del tejido sinovial de los animales artríticos, revela que los leucocitos PMN neutrófilos comienzan a acumularse a partir de los 14 d.p.i, esta infiltración indica el comienzo del proceso inflamatorio y su presencia, aunque discreta, está asociada a la liberación de mediadores que conducirán a la acumulación progresiva de leucocitos, que en este estudio fue significativo sólo a partir del día 42 d.p.i., fecha coincidente con el aumento significativo de fibrosis, etapa asociada a la fase crónica de la inflamación. Estos hallazgos coinciden con el concepto de inflamación crónica descrito por Cotran *et al.*, (2000), quienes identifican al macrófago como el tipo celular predominante en esta fase inflamatoria, el que estimulado por células T activadas (a través del IFN γ) va a producir fibrosis vía producción de factores de crecimiento, citocinas fibrogénicas y factores angiogénicos. Estas interacciones entre mediadores son las que establecen la base para la persistencia de la respuesta inflamatoria, la que finalmente lleva a que el daño progrese cada vez más.

La inmunomarcación de endotelio vascular, con el factor de von Willenbrand (FvW), detectó tempranamente (14d.p.i) el inicio de actividad angiónéica asociada con activación y proliferación endotelial. Sin embargo, la medición del área total correspondiente a vascularización efectiva (lecho vascular) de la membrana sinovial, fue significativa a los 42d.p.i, coincidiendo con el aumento de la densidad leucocitaria en el tejido articular. Esto indicaría, el rol fundamental que jugarían los vasos funcionales para el desarrollo de la enfermedad, ya que facilitaría una mayor llegada de células y mediadores inflamatorios al lugar, perpetuando, más aún, el proceso y llevándolo a una fase de cronicidad. Similares resultados mostraron Lu *et al.*, (2000), quienes usando este mismo modelo experimental, midieron vascularidad a través de la

detección del FvW y el VEGF, obteniendo altos valores de inmunomarcación al día 40d.p.i, atribuyendo a estos factores, un papel clave para el desarrollo de angiogénesis en respuesta a la acción de citoquinas como la IL-1, TNF α , IL-8 y al factor de crecimiento fibroblástico. Estos mismos autores, mencionan que el aumento de la celularidad en la sinovial artrítica produce un ambiente hipóxico, con la formación de radicales libres de oxígeno y NO, que en conjunto actúan para estimular la producción del VEGF. Sin embargo, el NO también es el responsable de producir mutaciones en el gen p53, disminuyendo la apoptosis a nivel de los fibroblastos sinoviales lo que contribuye al aumento del grosor en la membrana sinovial (Van`t Hof *et al.*, 2000), situación similar a lo observado en este estudio.

El índice de densidad celular a nivel de la membrana sinovial (IDCms), el grado de fibrosis (*pannus*) y aumento de vascularización, observado en nuestro modelo experimental, es consistente con lo informado por De Bandt *et al.*, (2003), quienes utilizando, también un modelo CIA, inhibieron la acción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) mediante un receptor de unión específico y encontraron, que en los animales tratados no se desarrolló la enfermedad, en cambio en los no tratados con inhibidor de VEGF comenzó de manera notoria la formación de *pannus* celular al día 32 d.p.i. No obstante, que nuestros resultados muestran formación ya significativa de *pannus*, al día 42, este se establecería después del día 28 d.p.i y antes del día 42 lo que sería similar a lo obtenido por De Bandt *et al.*, (2003).

Por otra parte, la detección histopatológica de daño del cartílago articular, es un evento que implica destrucción masiva de condrocitos, lo que se observó en forma significativa a los 42 d.p.i. Etapa que coincide con la mayor formación de fibrosis, angiogénesis e infiltración de células inflamatorias (IDCms), lo que en conjunto forma el *pannus* celular.. El daño

del cartílago articular, observado en este estudio, es consistente con lo señalado por McCachren *et al.*, (1990) y Aryeh *et al.*, (2006) quienes informan que en el *pannus* se presentan altos niveles de expresión metaloproteinasas de matriz (MMPs), siendo una de las más importantes en AR la MMP-1 (Colagenasa), la que tiene capacidad de degradar el colágeno tipo II presente en el cartílago articular, lo que contribuye a su destrucción, con la consiguiente erosión del hueso articular.

Los resultados logrados con inmunomarcación de fragmentación de ADN en condrocitos, como indicador de apoptosis, revelaron un incremento significativo del IAp a los 28 d.p.i, señalando precozmente indicios de daño a nivel del cartílago. Estos resultados concuerdan con lo realizado por Van't Hof *et al.*, (2000), quienes mediante método de TUNEL detectaron apoptosis en cartílago de pacientes artríticos. Ellos asociaron este daño a un ambiente inflamatorio con producción de óxido nítrico (NO) que es un reconocido agente apoptótico. A nivel de cartílago, NO es uno de los causantes de su destrucción, ya que además de inducir apoptosis, es responsable de inhibir la producción de matriz por parte de los condrocitos y activar la síntesis de MMP (Van't Hof *et al.*, 2000),

Al relacionar los resultados histopatológicos con el índice artrítico (IA), obtenidos en los animales experimentales, se observó que a los 14 d.p.i la infiltración leucocitaria aún no fue tan intensa como para producir efectos clínicos macroscópicos (IA= 0), situación que cambia cuando el *pannus* sinovial invade y destruye los tejidos adyacentes, coincidiendo clínicamente con IA= 2 (42 d.p.i) . Situación no consignada por otros autores.

Así, es sólo al día 28 d.p.i en que comienzan a verse diferencias significativas, promediando un grado IA de 1 (signos de eritema articular), y ya el IA promedio era 2 (hinchazón y edema), lo que estaría relacionado

principalmente por la considerable infiltración de células inflamatorias a nivel de la membrana sinovial.

Por lo tanto, en ese modelo, tanto el índice apoptótico como la angiogénesis son los primeros indicadores histológicos de CIA, resultando significativos ya a los 28 d.p.i. En este período, a nivel clínico comienzan a aparecer las primeras manifestaciones de la enfermedad con un índice artrítico promedio cercano a 1.

La histopatología convencional y la inmunohistoquímica permitieron detectar cambios tempranos que, aunque discretos, son claros indicadores del inicio del establecimiento del proceso inflamatorio como es la aparición de PMN neutrófilos en la membrana sinovial, proliferación endotelial con desarrollo de brotes angiogénicos y aumento de la actividad apoptótica en el cartílago articular.

Un hallazgo ciertamente interesante es el hecho que el aumento de ambos parámetros, angiogénesis y apoptosis están altamente correlacionados con el aumento de la severidad clínica (IA), por tanto, son aspectos importantes de estudiar para diseñar futuros esquemas terapéuticos que apunten a controlar estos sucesos.

9. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación se puede concluir:

1. En este modelo experimental se logró reproducir con éxito el cuadro clínico de artritis inducida con colágeno bovino tipo II, observándose cambios macroscópicos considerados en el IA= 1 a partir del día 28d.p.i, detectándose más temprano, a partir del día 14d.p.i., los primeros cambios histopatológicos.
2. Cuando los animales presentan un promedio de IA = 2 o superior (42d.p.i) ya se encuentra establecida la fase de inflamación crónica, que caracteriza a esta enfermedad.
3. El aumento de angiogénesis y apoptosis están altamente correlacionados con el aumento del índice de severidad clínica (IA).
4. La histopatología convencional y la inmunohistoquímica permitieron detectar cambios tempranos que, aunque discretos, son claros indicadores del inicio del establecimiento del proceso inflamatorio como la aparición de PMN neutrófilos en la membrana sinovial, proliferación endotelial con desarrollo de brotes angiogénicos y el aumento de la actividad apoptótica de condrocitos.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. **ALFARO, E.; GARCIA, C.; DUEÑAS, A.** 2000. Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. 46(4):275-280.
2. **ARYEH,M.; ABELES, M.D.; MICHAEL, H.; PILLINGER, M.D.** 2006. The role of the sinovial fibroblast in rheumatodi arthritis - cartilage destruction and the regulation of matrix metalloproteinases. Bull Hosp Jt Dis. 64(1-2):20-24.
3. **ASAHARA, H.; FUJISAWA, K.; KOBATA, T.; HASUNUMA, T.; MAEDA, T.; ASANUMA, M.; OGAWA, N.; INOUE, H.; SUMIDA, T.; NISHIOKA, K.** 1997. Direct evidence of high DNA binding activity of transcription factor AP-1 in rheumatoid arthritis synovium. Arthritis Rheum. 40:912-918.
4. **ATHANASOU, N. A.; QUINN, J.** 1991. Immunocytochemical analysis of human synovial lining cells: phenotypic relation to other marrow derived cells. Ann Rheum Dis. 50: 311-5. Bibliographic Links Library Holdings
5. **BAI, S.; LIU, H.; CHEN, K. H.; EKSARKO, P.; PERLMAN, H.; MOORE, T. L; POPE, R. M.** 2004. NF- κ B- Regulated expresion of cellular FLIP protects rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from tumor necrosis factor α -mediated apoptosis. 50(12):3844-3855.
6. **BARBERÁ, A.; DOMINGUEZ, M.** 2004. Características e inmunopatogénesis de la artritis reumatoide. Estado actual en el tratamiento. Biotecnología aplicada. 21:189-201.

7. **BENJAMIN, C.W.; HIEBSCH,R.R.; JONES, D.A.** 1998. Caspase activation in MCF7 cells responding to etoposide treatment. *Mol Pharmacol.* 53:446-450.
8. **BISCHOFF, J.** 1997. Cell adhesion and angiogenesis. *J.Clin. Invest.* 99(3):373-376.
9. **BREIER, G.F.; BREVIARIO, L.; CAVEDA, L.; BERTHIER, H.; SCHNURCHS, U.; GOTSCH, D.; VESTWEBER, W.; DEJANA, E.** 1996. Molecular cloning and expresión of murine vascular endotelial-cadherin in early stage development of the cardiovascular system. *Blood.* 86:630-641.
10. **CANTWELL, M.J.; HUA, T.; ZVAIFLER, N.J.; IPPS, T.J.** 1992. Deficient Fas ligand expresión by synovial lymphocytes from patients with rheumatoid artrhitis. *Arthritis Rheum.* 35:1170-8.
11. **CARMELLET, P.; RAKESH, K.J.** 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 407:249-257.
12. **COLVILLE-NASH, P.R.;SCOUT, D.L.** 1992. Angiogenesis and rheumatoid arthritis: patogenic and therapeutic implications. *Ann Rheum Dis.* 51:919 – 925.
13. **COTRAN, R.S.; ROBBINS, S.L.; KUMAR, V.** 2000. Patología estructural y funcional. 6ª ed. Interamericana McGraw-Hill. México DF, México.

14. **COURTENAY, J.S.; DALLMAN, M.J.; DAYAN, A.D.; MARTIN, A.; MOSEDALE, B.**1980. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*. 283:666-668.
15. **DAVIS, L.S.** 2003. A question of transformation. The synovial fibroblast in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol*. 162(5):1399:1402.
16. **DE BANDT, M.; BEN MAHDI, M.H.; OLLIVIER, V.; GROSSIN, M.; DUPUIS, M.; GAUDRY, M. ; BOHLEN, P. ; LIPSON, K.E. ; RICE, A. ; WU, Y. ; GOUGEROT-POCIDALO, M.A.; PASQUIER, C.** 2003. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor I (VEGF –RI), but no VEGF-RII, suppresses joint destruction in the K/BxN model of rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 1;171(9):4853-9.
17. **DELEURAN, B.W.;CHU, C.Q.;FIELD, M.; BRENNAN, F.M.; MITCHEL, T.; FELDMAN, M.** 1992. Localization of tumor necrosis factor receptors in the synovial tissue and cartilage – pannus junction in patients with rheumatoid arthritis: implications for local actions of tumor necrosis factor α . *Arthritis Rheum*. 32:1170-8.
18. **DENIS, C.V.** 2002. Molecular and cellular biology of Von Willenbrand factor. *Int J Hematol*. 75:3-8.
19. **EDWARDS, J.C.W.** 1994. The nature and origins of sinovium: experimental approaches to the study of synoviocyte differentiation. *J. Anat*. 184:493-501.

20. **GHIDOTTI, G.G.; URBANI, ALFIERI, R.** 1995. Genetic control of apoptosis. *Fund Clin Immunol.* 3:56-58.
21. **GREEN, D.R.; MCGAHON, A.; MARTIN, S.J.** 1996. Regulation of apoptosis by oncogenes. *J Cell Biochem.* 60:33-38.
22. **HENDERSON, B.; EDWARD, J. C .** 1987. Structure of synovial lining. In: *The synovial lining in health and disease.* Cambridge: Chapman and Hall Medical. 17-40.
23. **HIROITO, S.; YASUSHI, K.; MICHIHIRO, S.; YASUCHI, N.; AKIMITSU, T.; HITOSHI, S.; YUKISHI, O.; TOSHIAKI,S.; HIDEO, S.; NNOBUIRO, Y.** 2001. Neutralization of vascular endothelial growth factor prevent collagen-induce arthritis and ameliorates established diseased in mice. 281:562-568.
24. **HOLIAN, A.; HAMILTON, R.F.; MORANDI, M.T.; BROWUN, S.D.** 1998. Urban particle-induced apoptosis and phenotype shifts in human alveolar macrophages. *Environ Healts Perspects.* 106::127-132.
25. **HSU, H.; XIONG, J.; GOEDEL, D.V.** 1995. The TNF receptor 1 associated protein TRADD signals cell death and NF- κ B activation. *Cell.* 81:495-504.
26. **JANEWAY ,C.; TRAVERS, P.; WALPORT.** 1999. Immunobiology, the immune system in health and disease. forth edition. Current biology publications.13:490-507.

27. **JOU, I.M. ; SHIAU, A.L.; CHEN, S.Y.; WANG, C.R.; SHIEH, D.B.; TSAI, C.S.; WU, L.C.** 2005. Thrombospondin 1 as an effective gene therapeutic strategy in collagen induced arthritis. . *Arthritis and Rheumatism* . 52(1):339-344.
28. **KNIGHT, A.D.; LEVICK.; J. R.** 1983. Density and distribution of capillaries around a synovial cavity. *Q J Exp Physiol*. 68: 629-44.
29. **KOBAYASHI, I; ZIF, M.** 1975. Electrón microscopio studies of the cartilage–pannus junction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* . 18: 475-483).
30. **KOCH, A.E.** 2003. Angiogenesis as target in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 62(2):60-67.
31. **KOCH, A.E.; HALLORAN, M.M.; HASKELL, C.J.; SHAH, M.R.; POLVERINI, P.J.** 1995. Angigenesis mediated by soluble form of E-Selectin and vascular cell adhesion molecule -1. *Nature*. 376:517-519.
32. **KREY, P.R.; COHEN.; A.S.** 1973. Fine structural analysis of rabbit synovial cells. I. The normal synovium and changes in organ culture. *Arth. Rheum*. 16: 324-340.
33. **LEE, D.M.; WEINBLATT, M.E.** 2001. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 358:903-911.

34. **LOPEZ, M.C.; LEYTON, M.** 1982. Técnicas de histología y citología. 2^a ed. Depto. de Biología y Genética, Fac. Medicina. Universidad de Chile. Santiago. Chile. 242p.
35. **LU, J.; KASAMA,T.; KOBAYASHI, K.; YODA, Y.; SHIOZAWA,F.; HANYUDA, M.; NEGISHI, M.; IDE, HIROTSUGU, ADACHI, M.** 2000. Vascular endothelial growth factor expression and regulation of murine collagen-induced arthritis. *The J of Immunol.* 164:5922-5927.
36. **LUSCINKAS, F.W., LAWLER, J.** 1994. Integrins as dynamic regulators of vascular functions. *FASEB. J.*8: 929-938.
37. **MACNAUL, K.L.; HUTCHINSON, N.I.; PARSONS, J.N.; BAYNE, E.K.; TOCCI, M.J.** 1990. Analysis of IL-1 and TNF-alpha gene expression in human rheumatoid synoviocytes and normal monocytes by in situ hybridization. *J Immunol.* 145(12):4154-66.).
38. **MARTIN, S.M.; LENNON, S.V.; BONHAM, A.M.;COTTER, C.G.** 1990. Induction of apoptosis (programed cell death) in human leukaemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis. *J. Immunol.* 145:1859-1867.
39. **MCCACHREN, S.S.; HAYNES, B.F.; NIEDEL, J.E.** 1990. Localization of collagenase in rheumatoid arthritis synovium by in situ hybridization histochemistry. *J Clin Immunol.* 10:19-27.

40. **MOUNTZ , J.D., WU, J.; CHENG, J.; ZHOU, T.** 1994. Autoimmune disease: a problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum.* 37:1415 – 1420.
41. **PALEOLOG, E.M.** 2002. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 4 (3): S81- S90.
42. **PALEOLOG, E.M.; YOUNG, S.; STARK, A.C.; MCCLOSKEY, R.V.; FELDMAN, M.; MAINI, R.M.** 1998. Modulations of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 41:1258.1265.
43. **PAPETTI, M AND HERNAN, I.M.** 2002. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol.* 282: C947-C970.
44. **RICH, T.; WATSON, C.J.; WYLLIE, A.** 1999. Apoptosis: the germs of death. *Nature Cell Biology.* 1:E69-E71.
45. **SAN MIGUEL, A.; IGLESIAS,R.; ALONSO, N., CALVO.B.** 2006. Apoptosis. Muerte celular programada. *Diagnostico in vitro.* 4/66.
46. **SAS INSTITUTE.** 2000. User's Guide: Statistics. Version 8.2, Edition. SAS Institute Inc. Cary, N.C.
47. **SMOLEN, J.S.;STEINER, G.** 2003. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov.* 2(6):473-88.

48. **STEEL, R. G. D.; TORRIE, J.H.** 1980. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. Second Edition, México, McGraw-Hill, New York.
49. **THOSHIHICO, I.; MITSUMORI, S.; HIROKO, K.; HARUCO, Y.; KAYOKO, N.** 2000. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joints. *Arch.Histol.Cytol.* 63: (1) p 17-31.
50. **VAN'T HOF, R.J.; HOCKING, L.; WRIGHT, P.K.; RALSTON, S.H.** 2000. Nitric oxide is a mediator of apoptosis in the rheumatoid joint. *Rheumatology.* 39: 1004-1008.
51. **YUASA, T.; KUBO, S.; YOSHINO, T.; UJIKE, A.; MATSUMURA, K.; ONO, M.; RAVETCH, J.V.; TAKAI, T.** 1999. Deletion of fcγ receptor IIB renders H-2(b) mice susceptible to collagen-induced arthritis. *J Exp Med.* 189(1):187-194.
52. **WALSH, D.A.** 1999. Angiogenesis and arthritis. *Rheumatology.* 38: 103-112.
53. **WICKS, I.; MCCOLL, G.; HARRISON, L.** 1994. New perspectives on rheumatoid arthritis. *Immunol Today.* 15(12):553-6.
54. **ZUSUKI, M.; UETSUKA, K, ZUSUKI, M.; SHINOZUCA, J.; NAKALLAMA, H.; DOI,K.** 1997. Immunohistochemical study on type II collagen-induced arthritis in DBA/1j mice. *Exp. Anim.* 46(4):259-267.

ANEXO N°1: SILANIZACIÓN DE PORTABOJETOS

SOLUCIONES: 3- aminopropythiethoxysilane (xilano) al 2% en acetona pura (p.a).

PROCEDIMIENTOS:

- Limpiar los portaobjetos con solución de alcohol-clorhídrico (etanol 95% con 0,5 de HCL).
- Enjuagar en acetona pura p.a durante 1 minuto (este primer enjuague puede ser en acetona común para ahorrar la acetona p.a).
- Sumergir los portaobjetos en solución de 3- aminopropythiethoxysilane (xilano) al 2% en acetona p.a durante 3 minutos.
- Enjuagar en acetona p.a (esta si debe ser acetona pura) por 15 segundos.
- Secar rápidamente utilizando aire caliente (secador).
- Dejar secar durante 1 hora a 60°C o toda la noche a temperatura ambiente .

**ANEXO N°2: PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA
INMUNOTINCIÓN DE ANGIOGÉNESIS CON FACTOR DE VON
WILLENBRAND (FvW)**

1. DESPARAFINAR CORTES HASTA AGUA DESTILADA:

Xilol 1 = 5 min.

Xilol 2 = 5 min.

Xilol3 = 5 min.

Alcohol 99°(1) = 5 min.

Alcohol99° (2) = 5 min.

Alcohol96° (1) = 5min.

Alcohol96°(2) = 5min

Alcohol96° (3) = 5 min.

Agua destilada = 5 min.

Retirar exceso de agua con una gasa, y marcar alrededor de la muestra con lápiz hidrofóbico.

2. Recuperación de inmunoreactividad, con “Proteinasas K enzima”.(Dako, USA) Una gota (40µl) en 2 ml de PBS (pH 7.2) a temperatura ambiente en agitador durante 15 minutos.
3. Lavado con agua destilada: Un enjuague rápido y tres lavados de 5 minutos cada uno.
4. Bloqueo de peroxidasa endógena, con agua oxigenada 10 volúmenes al 3% durante 25 minutos en el agitador a temperatura ambiente.
5. Lavado con agua destilada, un enjuague rápido y tres lavados de 5 minutos cada uno, el último lavado con PBS (pH 7.2).
6. Bloqueo de uniones inespecíficas, con PBS + BSA al 1%, durante 25 min en agitador a temperatura ambiente sin lavar.
7. Incubación con anticuerpo primario, anti-factor de von Willenbrand en concentración 0,5:1000 en PBS más BSA al 1% durante toda la noche a 4°C.

8. Dejar una hora a temperatura ambiente previo al lavado.
9. Lavado en PBS pH 7,2 . Un lavado rápido y tres lavados de 5 minutos cada uno.
10. Incubación con anticuerpo secundario, biotinilado anti.rabbit para factor de von Willenbrand en concentración de 1:200 en PBS más BSA al 1% durante 60 minutos a temperatura ambiente.
11. Lavado en PBS pH 7,2, un lavado rápido y tres lavados de 5 minutos cada uno.
12. Incubación con conjugado de estreptavidina/peroxidasa, diluido 1:200 en PBS más BSA al 1% durante 60 minutos a temperatura ambiente.
13. Lavado en PBS pH 7,2 a 7,4, un lavado rápido y tres lavados de 5 minutos cada uno.
14. Incubar con solución sustrato cromógeno DAB. 1 gota en 2 ml de buffer durante 3 minutos, de oscuridad.
15. Lavado con agua destilada: Un enjuague rápido y dos lavados de 5 minutos cada uno.
16. Contratinción con Hematoxilina: paso rápido por Hematoxilina.
17. Lavar bien en agua corriente.
18. Carbonato de litio por 3 minutos.
19. Lavado en agua corriente por 5 minutos.
20. Alcohol 96°, rápido 1 minuto.
21. Alcohol 100° rápido 1 minuto.
22. Alcohol 100° 5 minutos.
23. Alcohol 100°, 5 minutos.
24. Xiloles I, II y III 5 minutos cada uno.
25. Montaje.

ANEXO N°3: PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECCIÓN DE APOPTOSIS CELULAR (MÉTODO DE TUNEL) KIT APOPTAG ®

1. Desparafinar cortes histológicos:

Xilol 1 = 5 min.

Xilol 2 = 5 min.

Xilol3 = 5 min.

Alcohol 99°(1) = 5 min.

Alcohol99° (2) = 5 min.

Alcohol96° (1) = 5min.

Alcohol96°(2) = 5min

Alcohol96° (3) = 5 min.

2. Sumergir muestras en PBS pH 7,4 durante 5 minutos.

Retirar exceso de agua con una gasa, y marcar alrededor de la muestra con lápiz hidrofóbico.

3. Recuperación antigénica, aplicar Proteinasa K (20µg/ml) durante 15 minutos.

4. Dos Lavados con PBS (pH 7,4)5 minutos cada uno

5. Bloqueo de peroxidasa endógena, tratar las muestras con 3% de agua oxigenada en PBS durante 25 minutos.

6. Lavar dos veces con PBS (pH 7,4) 5 minutos cada uno.

7. Aplicar buffer equilibrante, retirar el exceso de líquido, luego aplicar inmediatamente 70µl de buffer directamente en la muestra. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

8. Retirar el exceso de liquido, y aplicar inmediatamente 55µl de enzima TdT.

9. Incubar en cámara húmeda en estufa universal a 37°C por una hora.

10. Detener actividad enzimática con inhibidor (Working strength stop/wash buffer) agitar por 15 segundos e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

11. Lavar las muestras 3 veces en PBS (pH 7,4) 3 minutos por vez.

12. Retirar el exceso de líquido cuidadosamente.
13. Aplicar anticuerpo Antidoxigenina peroxidasa conjugada, para este tamaño de muestras son 55µl y quedan totalmente cubiertas), e incubar en cámara húmeda por 30 minutos a temperatura ambiente.
14. Lavar las muestras con PBS pH 7,4 tres veces, durante tres minutos cada vez a temperatura ambiente.
15. Revelar el color en sustrato de Peroxidasa, retirar el exceso de líquido cuidadosamente, y aplicar suficiente peroxidasa (55µl), durante 3 minutos a temperatura ambiente.
16. Lavar las muestras en tres cambios de agua destilada por 1 minutos cada vez y luego incubar con agua destilada durante 5 minutos.
17. Contratinción con Hematoxilina durante un segundo.
18. Lavar con agua corriente durante 5 minutos y luego sumergir las muestras en carbonato de litio por 3 minutos.
19. Lavar las muestras con agua corriente por 5 minutos
20. Alcohol 96°, rápido 1 minuto.
21. Alcohol 100° rápido 1 minuto.
22. alcohol 100° 5 minutos.
23. Alcohol 100°, 5 minutos.
24. Xiloles I, II y III 5 minutos cada uno.
25. Montaje.

