

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“Rol terapéutico de Células Dendríticas reguladoras en el
modelo murino de artritis mediante evaluación
histopatológica de articulaciones”.**

María Corina Peña Jiménez

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS MÉDICAS Y
BIOLÓGICAS
MENCION MORFOLOGÍA**

Director de Tesis: Prof. Dr. Juan Carlos Aguillón Gutiérrez.

2013

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“Rol terapéutico de Células Dendríticas reguladoras en el
modelo murino de artritis mediante evaluación
histopatológica de articulaciones”.**

María Corina Peña Jiménez

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS MÉDICAS Y
BIOLÓGICAS
MENCION MORFOLOGÍA**

Director de Tesis: Prof. Dr. Juan Carlos Aguilón Gutiérrez.

2013

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

MARÍA CORINA PEÑA JIMÉNEZ

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias Médicas y Ciencias Biológicas con mención en Morfología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 25 de Julio del 2013.

**Prof. Dr. Juan Carlos Aguillón Gutiérrez
Director de Tesis
Programa Disciplinario de Inmunología
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

**Prof. Dra. Ulrike Kemmerling
Programa Anatomía y Biología del Desarrollo**

**Prof. Dra. Carolina Valck
Programa Disciplinario de
Inmunología**

**Prof. Dr. Héctor Rodríguez
Programa Anatomía y Biología del Desarrollo**

**Prof. Dra. Cleofina Bosco
Presidente Comisión**

**...Recuerda que cualquier momento
es bueno para comenzar
y que ninguno es tan terrible
para claudicar...**

AGRADECIMIENTOS.

Ya era tiempo de cerrar etapas, de concluir lo que se había empezado y ha llegado el día de poder terminar esta gran aventura.

Agradezco ante todo la posibilidad de contar con el apoyo de mucha gente que me quiere, de la fuerza espiritual que me ha mantenido en pie ante diversas adversidades que se presentaron en el camino, pero que ahora me hacen sentir plena satisfacción de lo logrado.

Muchas gracias a mi familia, un pilar fundamental, especialmente a mis padres, Carlos e Isabel, a mis hermanos Carlos y Carla, de todos los cuales he recibido su apoyo.

A la persona maravillosa, el hombre que hizo que retomara esta actividad, del cual he recibido el mayor apoyo, al hombre que en unos meses más será mi esposo, Luis Ramírez, gracias por ser TÚ el que acompaña mi camino. Te amo.

No hubiese logrado este objetivo sin contar con mis amigos, siempre una palabra de aliento para seguir con esta actividad y en la vida, mi gratitud sincera a mi amiga incondicional Lina, a Mirna que desde las lejanas tierras de Australia me instó a seguir adelante, a Susan, Gerardo, a mis colegas que me apoyaron para poder terminar de buena forma el magíster, Aldo, Germán y el equipo de Morfofunción de la Universidad Diego Portales.

A todos los que en algún minuto acompañaron mi vida y que ya no están físicamente, mis gracias hasta el bello lugar en que estoy segura que se encuentran.

Mi reconocimiento a la persona que me instó a realizar el magíster, mi mentora la Doctora Raquel Cepeda, que me dio la posibilidad de trabajar en lo que me apasiona que es la docencia en las disciplinas de Histología y Embriología.

Sinceramente mi agradecimiento al Dr. Juan Carlos Aguillón, del Programa Disciplinario de Inmunología, ICBM, Universidad de Chile, por abrirme las puertas de su laboratorio y apoyarme en todo el tiempo que llevó el término de la tesis de Magíster. A todos los investigadores del laboratorio especialmente a Alexis y Diego por su gran amabilidad. A la señora Nancy Fabres por acompañarme en las labores experimentales.

Gracias por la disposición a los profesores correctores, Dra. Ulrike Kemmerling, Dra. Carolina Valk y Dr. Héctor Rodríguez. También a la Dra. Marcela Fuenzalida, por su gran disposición cuando presidía la comisión del Magíster.

Muchas gracias a todos, uno muchas veces se cuestiona las cosas que ocurren, pero después de un rato (ya sea corto o largo) le encuentra sentido y en todo este tiempo que me llevó concluir esta memoria crecí como persona y eso NO tiene precio.

ÍNDICE.

Página

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN.....1-11

HIPÓTESIS.....12

OBJETIVO GENERAL.....12

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....12-13

MATERIALES Y MÉTODOS.....13-17

RESULTADOS.....18-41

DISCUSIÓN.....42-45

CONCLUSIÓN.....46-47

BIBLIOGRAFÍA.....	48-57
--------------------------	--------------

RESUMEN.

La artritis reumatoide (AR) es la enfermedad articular inflamatoria más común que afecta al 1% de la población mundial, de causas multifactoriales, poligénica y autoinmune. Se caracteriza por inflamación articular crónica y posterior destrucción del cartílago y hueso provocando deformidad, reducción en la calidad de vida, muerte prematura y elevados costos económicos.

La presente investigación estudia durante el curso de la enfermedad los efectos de la utilización como herramienta terapéutica el uso de Células Dendríticas (DCs) estimuladas por cortos periodos con lipopolisacárido (LPS) y cargadas con colágeno bovino tipo II, complementando con inyección intraperitoneal de corticoide (Dexametasona) entre los días 29 a 34 post-inoculación, utilizando el modelo murino de Artritis Reumatoide inducida con colágeno tipo II (CIA). Logrando obtener su relación con cambios macroscópicos reflejados en los índices Swollen Joint Severity (inflamación articular), Joint Score (número de articulaciones afectadas) obtenidos con medición de pie de metro tres veces por semana e Índice Artrítico (IA), y microscópicos con la medición de puntaje de daño histopatológico a nivel del cartílago articular y fibrosis a nivel de la membrana sinovial en muestras histológicas obtenidas luego del sacrificio de 5 ratones de la cepa DBA1/lacJ (H2^d) en cada uno de los 6 grupos de estudio: CIA, CIA+DEXA, CIA+4hLPS/CII/DCs, CIA+DEXA/4hLPS/DCs, CIA+DEXA/CII/DCs, CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs en los días 47 y 70 post-inoculación CIA para observar los cambios durante el transcurso de la enfermedad.

El pre-acondicionamiento con dexametasona de los ratones con CIA establecida fue capaz de interferir con la aparición y progresión de la enfermedad durante un corto periodo. Sin embargo, esta disminución rápida de la inflamación facilitó el despliegue de DCs

tolerogénicas pulsadas con antígeno, mostrando una mayor eficacia en el control de progresión de CIA, que la observada en ratones CIA inoculados con DCs tolerogénicas sin acondicionamiento con dexametasona. Esto se ve reflejado en la diferencia estadísticamente significativa en los distintos parámetros estudiados entre el grupo CIA, grupo CIA+4hLPS/CII/DCs y grupo CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs.

La histopatología convencional y la histoquímica permitieron observar los cambios a nivel de membrana y cartílago articular en los distintos grupos de estudio, corroborando la severidad de los signos clínicos a través del transcurso y tratamiento CIA.

Palabras claves: Artritis reumatoide, CIA, Células dendríticas, Dexametasona.

ABSTRACT.

Rheumatoid Arthritis (RA) is the most common inflammatory joint disease which affects over 1% of the world's population. It is caused by multifactorial, polygenic and autoimmune disorders. It is characterized by chronic inflammation and subsequent destruction of the cartilage and bone, causing deformity, reduction in the quality of life, premature death and high economic costs.

This research study, during the course of the disease, studied the effects of the use of various therapeutic tools such as the use of dendritic cells (DCs) stimulated by short periods with lipopolysaccharide (LPS) and loaded with bovine collagen type II, complemented by intraperitoneal injection of corticosteroid, in this case Dexamethasone, between 29 to 34 post-inoculations, in which was used a murine model of rheumatoid arthritis induced with collagen type II (CIA), able to obtain its relationship with macroscopic changes reflected in the Swollen Joint Severity Index (joint inflammation) and Joint Score (number of affected joints) obtained with measurement of a caliper everyday and microscopics measured with the Arthritic Index, scores of histopathological damage at the level of the joint cartilage and fibrosis at the level of the synovial membrane in histological samples obtained after the sacrifice of 5 mice of the strain DBA1/lacJ (H2q) in each of the 6 study groups: CIA, CIA DEXA, CIA 4hLPS/IIC/DCs, CIA DEXA/4hLPS/DCs, CIA DEXA/IIC/DCs, CIA DEXA 4hLPS/IIC/DCs in 47 days and 70 post-inoculation CIA to observe the changes during the course of the disease.

The corticosteroid preconditioning of mice with established CIA may significantly reduce the inflammatory status, thereby strengthening the regulatory activity of tolerogenic 4hLPS/CII/DCs. The conditioning with Dexamethasone was able to interfere with disease onset and progression during a short period. However, this quenching of the inflammation could have facilitated that antigen-pulsed tolerogenic DCs display a higher effectiveness in controlling CIA progression than that observed when tolerogenic DCs were inoculated without Dexamethasone conditioning.

This is reflected in the statistically significant difference in the various parameters studied between the CIA groups, CIA+4hLPS/CII/DCs y CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs.

The conventional histology and histochemistry allowed to observe the changes at the membrane and articular cartilage in the different study groups, confirming the severity of clinical signs throughout the course and treatment CIA.

Key Words: Rheumatoid arthritis, CIA, Dendritic cells, Dexamethasone.

INTRODUCCIÓN.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica y clínicamente heterogénea que afecta a múltiples articulaciones provocando inflamación crónica, destrucción progresiva de cartílago y hueso, y una severa deformidad de la articulación sinovial. La etiología de la AR aún no se conoce completamente, pero se ha demostrado que es una enfermedad que se caracteriza por la expresión de autoanticuerpos, regulación positiva de citoquinas y la participación de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) como factores de riesgo (Oestergaard *et al.*, 2008; Otero y B Goldring, 2007; Palmblad *et al.*, 2001; Tetlow y Woolley, 1995). Además, involucra inflamación crónica en varias articulaciones y destrucción del tejido articular que es resultado directo de la producción de metaloproteinasas y radicales libres por macrófagos, neutrófilos, sinoviocitos y condrocitos presentes en la articulación (Thoshihico *et al.*, 2000).

Las articulaciones afectadas corresponden a las del tipo diartrosis formadas por dos superficies opuestas de hueso que están cubiertas por cartílago hialino, lo que permite una baja fricción en la interface articular. La membrana sinovial del espacio articular es el sitio de producción del fluido sinovial, que otorga la nutrición del cartílago articular y lubrica la superficie cartilaginosa. La cápsula articular está compuesta de dos capas, una externa denominada “capa fibrosa”, compuesta por una densa capa de tejido conectivo y una interna llamada membrana sinovial o sinovia (Thoshihico *et al.*, 2000). Se acepta que el tejido sinovial normal, caracterizado por una capa superficial de células, también denominada íntima sinovial, está formado principalmente por fibroblastos, macrófagos, adipocitos, fibras nerviosas, capilares, ocasionalmente polimorfo nucleares y linfocitos.

La íntima sinovial se compone principalmente por dos tipos celulares: las tipos A, originadas a partir de la médula ósea, con características ultraestructurales de monocitos derivados de macrófagos. Se caracterizan por expresar marcadores de superficie como CD68 y CD14; y las de tipo B corresponden a fibroblastos que forman alrededor del 75% a 80% de la membrana. En el curso de AR, la inflamación a nivel de la membrana sinovial es el punto clave en la fisiopatología de la enfermedad. Histológicamente se caracteriza por presentar una pronunciada angiogénesis, hiperplasia celular, infiltración de leucocitos y cambios en la expresión de moléculas de adhesión en la superficie, además de proteinasas, inhibidores de proteinasas y citoquinas (Lee y Weinbatt, 2001).

La excesiva proliferación que experimentan las células de la membrana sinovial, provoca cambios en su estructura e induce la formación de un tejido de granulación denominado *pannus* (Barberá y Dominguez, 2004). El *pannus* invade y destruye su entorno local. Este tejido es el responsable de las erosiones que se observan en AR. En una primera fase el *pannus* celular compuesto de polimorfonucleares y fibroblastos presenta un gran nivel de expresión de metaloproteinasas (MMPs), destacándose en el curso de AR MMP-1, 3, 9, 10 y 13 (Aryeh *et al.*, 2006). En una fase más avanzada de la enfermedad, el *pannus* es reemplazado totalmente por un tejido fibroso mínimamente vascularizado (Kobayasi y Zif, 1975).

En la interfase entre la membrana sinovial de AR y el cartílago articular se forman acúmulos de células en proliferación observadas penetrando la matriz extracelular del cartílago. Del mismo modo, en la interfase entre la membrana sinovial inflamada y el hueso subcondral adyacente existe evidencia de la activación local de la resorción ósea con destrucción de la matriz ósea mineralizada, acompañada por células que expresan fenotipos

característicos de osteoclastos, incluyendo el mRNA del receptor de calcitonina, catepsina K y fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) (Pettit *et al.*, 2006). Aún cuando existe una asociación entre la inflamación y el desarrollo del daño articular, la destrucción puede progresar a pesar de la presencia de una actividad inflamatoria atenuada, más aun, las erosiones cartilagosas y óseas pueden desarrollarse en ausencia de signos clínicos de inflamación (van der Berg y van Riel 2005). Estudios recientes indican que a pesar de que los mecanismos celulares específicos de la destrucción cartilaginosa y ósea son diferentes, el Factor de Necrosis Tumoral- (TNF-), IL-1 y otras citoquinas proinflamatorias y mediadores pueden manejar elementos de ambos procesos (van Lent 2006). El desarrollo reciente de ensayos para marcadores biológicos específicos que reflejan los cambios cuantitativos y dinámicos en la síntesis y degradación de productos de los componentes de la matriz cartilaginosa y ósea ofrece la posibilidad de identificar los pacientes con riesgo de un rápido daño articular, y también la posibilidad de monitorear tempranamente la eficacia de terapias anti-reumáticas (Verstappen *et al.*,2006).

MODELO CIA

Un gran variedad de modelos experimentales de AR son utilizados para comprender las esta patología. Algunos modelos experimentales de AR son: Artritis Inducida por Antígeno (AIA), Artritis Inducida por Adyuvante (AA), Artritis Inducida por Colágeno (CIA), Artritis Autoinmune Espontánea (SAA). Todos ellos se caracterizan por inflamación de la membrana sinovial, daño del cartílago y destrucción ósea. En todos estos modelos experimentales hay una fase fundamental que debe ser críticamente examinada y esta corresponde a la fase temprana de la enfermedad, caracterizada por la transición de un estado inflamatorio agudo a

crónico. Estos modelos animales sirven para evaluar la aparición y los cambios en los niveles de citoquinas mientras la enfermedad progresa, desde el inicio de la inflamación articular, siendo de gran utilidad para la obtención de datos que pueden ayudar a revelar el rol de cada mediador en las diferentes fases del proceso inflamatorio y destructivo de la articulación (Ferraccioli *et al.*, 2010).

CIA presenta características inmunológicas similares a AR ya que involucra elevados niveles de auto-anticuerpos y células T colágeno específicas, lo que se obtiene inmunizando ratones DBA/1 con colágeno bovino tipo II. En este modelo de artritis, los anticuerpos anti-colágeno tipo II son vistos como factores importantes en el desarrollo de la AR, como la transferencia de suero de ratones enfermos puede inducir CIA en receptores DBA/1 sanos (Ferraccioli *et al.*, 2010).

El colágeno tipo II es uno de los posibles candidatos como autoantígeno en AR en humanos, estimulando clonotipos específicos que llevan al inicio de la fase temprana de AR. Los datos implican al colágeno tipo II como un autoantígeno para la ocurrencia de artritis en un modelo animal, el modelo de Artritis Inducida por Colágeno (CIA). CIA es una poliartritis inducida por sensibilización de cepas susceptibles de animales con colágeno tipo II. Ambas respuestas, celular y humoral, para el colágeno tipo II han sido observadas en animales sensibilizados, y ambos componentes están involucrados en la progresión de la enfermedad. Además, para la inflamación articular y el daño del cartílago y del hueso, se vinculan a genes residentes en el locus de histocompatibilidad y presencia de células T y B autoreactivas, similares a lo que ocurre en la enfermedad en humanos, haciendo de CIA uno de los modelos más usados para el estudio de la inflamación que ocurre durante el desarrollo de la artritis y la investigación de drogas que pueden ser utilizadas en enfermedades humanas.

En este modelo la IL-6 en el día 1 muestra un incremento significativo en el mRNA y en los niveles de proteína en el tejido sinovial, e IL-1 y TNF- al día 1 demuestran niveles más altos de mRNA que expresión de proteínas. TNF- muestra un aumento significativo de proteína entre los días 4 y 8. Al día 11, que representa el peak de la artritis, los niveles de proteína aún son significativamente muy altos para IL-1, y aunque a niveles más bajos que el día uno para IL-6, alcanzan los niveles más altos para TNF-, pero significativamente son los valores más bajos que se presentan si se compara con las otras dos citoquinas (Van Holten *et al.*, 2004). Por lo tanto en este modelo, cambios en IL-6 sugieren que esta citoquina juega un rol clave en la etapa temprana de la enfermedad y continúa siendo importante durante la transición a la fase más crónica. La inactivación del gen de IL-6 en ratones DBA/1J, muestra una protección completa de CIA, y ello puede ser asociado con una reducida respuesta de anticuerpos al colágeno tipo II y la ausencia de células inflamatorias y daño tisular en articulaciones (Ferraccioli *et al.*, 2010).

CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas (DC) tienen un rol clave en organizar la inmunidad a través de la presentación del antígeno a los linfocitos T, secretan citoquinas y quimioquinas que en conjunto inducen la respuesta de linfocitos T y B (Shortman y Naik, 2007).

Las DC humanas se distribuyen en dos subgrupos: DC mieloides o convencionales y DC plasmocitoides. Estos subgrupos constituyen una población heterogénea en su distribución en los tejidos, fenotipo y función (Shortman y Naik, 2007). Ambos grupos se encuentran en casi todos los tejidos periféricos, como en órganos linfoides primarios (timo y médula ósea) y órganos linfoides secundarios (linfonodos y bazo). Estas DCs pueden ser reconocidas por la

expresión de marcadores de superficie específicos y por sus propiedades inmunológicas (Shortman 1997; Shortman y Naik 2007). Así, las DC mieloides, se caracterizan por presentar las moléculas de superficie CD11b y CD11c, se ubican en los tejidos periféricos, en la zona marginal de los linfonodos, bazo y en sangre como células inmaduras, buscando constantemente antígenos exógenos y propios. El procesamiento antigénico por DCs en una infección microbiana y señales inflamatorias derivadas de lipopolisacáridos (LPS), TNF- α , IL-1 e IFN- γ , estimulan la diferenciación y migración de las DCs periféricas a los linfonodos regionales. Durante este proceso de diferenciación, también conocido como maduración, las DCs aumentan de tamaño, disminuyen su densidad y su capacidad de captura y procesamiento antigénico. Además, aumentan la expresión de moléculas presentadoras de antígenos MHC clase I y clase II cargadas con péptidos, de moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86), factores de crecimiento como IL-2, receptores de quimioquinas y moléculas de adhesión (Sánchez-Sánchez 2006). Las DCs maduras son capaces de gatillar mecanismos de inmunidad adaptativa, induciendo la activación de células T vírgenes y dirigiendo la diferenciación hacia linfocitos T efectores (Lebre y Tak, 2008).

La activación de los linfocitos T por las DCs, se produce por medio de tres señales: Una primera señal está dada por la unión del complejo péptido-MHC con el receptor antigénico del linfocito T (TCR), la segunda señal ocurre a través de la interacción de moléculas co-estimuladoras (CD80/CD86) con su receptor (CD28) y por último una tercera señal dada por el ambiente de citoquinas existente, que conduce a la diferenciación de linfocitos T en células efectoras Th1, Th2 o Th17, si se trata de linfocitos CD4+, o bien, a linfocitos T citotóxicos si son CD8+ (Moghaddami *et al.*, 2007).

CÉLULAS DENDRÍTICAS EN AR

Datos del rol de los subgrupos de DC en artritis experimental son escasos. Estudios realizados por Leung *et al.*, (2002) muestran que la presentación de péptidos derivados de colágeno por DC maduras, derivadas de médula ósea, es suficiente para la inducción de artritis en ratones DBA/1, pudiendo la CIA ser inhibida por el tratamiento con antagonistas de TNF. En contraste a otros modelos experimentales de artritis, la artritis localizada inducida por DC en el sitio de inyección no se generaliza espontáneamente a las articulaciones no involucradas, a pesar de la demostración de células T circulantes reactivas a colágeno. Además, las DC pulsadas con colágeno han podido ser observadas en las áreas de las células T, tanto en los linfonodos poplíteos como inguinales y algunas de las células T CD4+ asociadas con estas DC se encuentran activadas. Esto avala la función de las DC en la fase inductiva de la artritis en este modelo, involucrando la activación de células T en linfonodos locales (Moghaddami *et al.*,2007).

Muchos de los datos existentes de DC en artritis experimental señalan el uso de DC como herramienta terapéutica para aminorar la artritis. Al respecto, la vacunación de ratones CIA con DC inmaduras y DC activadas por 24 horas con LPS tienen efectos significativos en el curso de la enfermedad; la administración de DC moduladas con TNF propagadas en GM-CSF con o sin IL-4 han evidenciado un retraso del inicio de la artritis y un menor “score” clínico. Van Duivenvoorde *et al.* (2007) observaron una disminución específica en la respuesta colágeno-específica Th1, evaluada a través de los títulos de IgG2a, mientras que los niveles de IgG1 no fueron afectados. Estos hallazgos dan razones para la utilización inmunoterapéutica de las DC en AR.

Además, recientemente se ha descrito que inyecciones repetitivas con DC inmaduras gatillan la expansión de poblaciones de células T reguladoras, con grandes propiedades inmunomoduladoras, capaces de proteger ratones de CIA. Estas células T reguladoras fueron caracterizadas por la expresión de la molécula CD49b y por la producción de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 (Charbonnier *et al.*, 2006). Estos datos demuestran que las DC inmaduras pueden expandir y activar una nueva población de células T reguladoras CD49b+, con un alto poder inmunosupresivo y capaz de proteger de una enfermedad autoinmune.

Van Duivenvoorde *et al.* (2007) estudió DC derivadas de médula ósea estimuladas con TNF, IL-10 o dexametasona, los resultados obtenidos se resumen en que todos los subgrupos de DC analizados fueron capaces de inhibir la inducción de CIA, pero la modulación de la respuesta inmune fue diferente. La vacunación con DC moduladas con TNF o IL-10 alteró el balance Th1/Th2 lo que se evidenció por la inducción de células T que secretan IL-5 e IL-10 y la reducción concomitante de la razón IgG2a/IgG1 contra el antígeno inmunizado. En contraste, las DC moduladas con dexametasona no afectaron la razón de IL-5 versus IFN producidas por las células T y tendieron a afectar la respuesta de anticuerpos en una manera no específica.

Salazar *et al.*, (2008) utilizando DC semi-maduras demostró que éstas pueden afectar el resultado de CIA de manera antígeno específica, lo que se reflejó en que ratones inoculados con 4hLPS/CII/DCs, después de establecida la CIA, desarrollaron la enfermedad de forma menos severa, lo que fue determinado a través del índice de inflamación e índice artrítico. Esto también fue corroborado por medio de evaluación histológica que reveló que los ratones tratados con 4hLPS/CII/DCs desarrollaron en sus extremidades una menor sinovitis, menor formación de pannus, mínimo daño del cartílago y fibrosis. Además, el bloqueo *ex vivo* de la

producción de IFN γ antígeno-específico por 4hLPS/CII/DCs sugirió que la inhibición de la progresión de la artritis podría ser consecuencia de la inhibición *in vivo* de la producción de IFN γ responsable del daño observado en CIA. La diferenciación de células naïve T CD4⁺ a células Th1 que producen IFN γ es crítica para la generación de anticuerpos IgG2a en ratones, logrando en este estudio determinar que la inoculación con 4hLPS/CII/DCs modificó el patrón Th1 establecido en ratones con CIA.

Como las DC son células presentadoras de antígenos (APC) que juegan roles claves en iniciar la respuesta inmune específica, al unir la inmunidad innata con la inmunidad adaptativa, es de particular interés investigar los potenciales roles de estas células con el fin de diseñar estrategias basadas en DC para modular el proceso artrítico. Es por esto que las DC son de gran interés para aplicaciones clínicas en autoinmunidad, especialmente si se trata de un subgrupo de DC que puede inducir tolerancia antígeno-específica. De este modo, es importante descifrar las características funcionales de los subgrupos de DC en artritis, en orden de revelar aquellas subpoblaciones que pueden constituir el problema o la solución al proceso autoinmune. Estrategias que ayuden a identificar las moléculas derivadas de DC involucradas en la iniciación/perpetuación de la artritis, estimulación de células T y diferenciación de células B en productoras de auto-anticuerpos, son importantes promesas para un futuro tratamiento de AR (Lebre y Tak, 2008).

CORTICOSTEROIDES.

Los glucocorticoides o corticosteroides son fármacos antialérgicos e inmunosupresores derivados del cortisol o hidrocortisona, hormona producida por la corteza de la glándula suprarrenal. Su uso terapéutico fuera de la endocrinología data de la observación realizada por

el reumatólogo Philip Hench quien, suponiendo que los pacientes con AR tenían un déficit adrenal, inyectó en algunos pacientes cortisona, molécula de reciente producción industrial. El resultado obtenido fue tan contundente que se toma como ejemplo en la medicina traslacional. En la actualidad, los glucocorticoides figuran entre las drogas más usadas, y paralelamente, más temidas (Serra et al., 2012).

ACCIONES FARMACOLÓGICAS:

Efectos antiinflamatorios, antialérgicos e inmunosupresores constituyen la base terapéutica y se deben a la inhibición de:

- Producción y secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- IFN- y GM-CSF, por interferencia directa sobre las cascadas y mecanismos genómicos.
- Acumulación de macrófagos y neutrófilos en focos inflamatorios, por reprimir la expresión de las moléculas de adhesión endoteliales y la síntesis del activador de plasminógeno.
- Síntesis y liberación de autacoides y de enzimas lisosomales en las reacciones de fase aguda.
- Degranulación y respuesta de los mastocitos a la IgE.
- Expansión clonal y citotoxicidad espontánea mediada por células T.

Nuevas evidencias indican que los corticoides son más inmunorreguladores que inmunosupresores pues no anulan la secreción de ciertas citoquinas (IL-4, GM-CSF y TGF-); aumentan la expresión de correceptores para casi todas las citoquinas (subunidad gp130) y optimizan el curso temporal de la respuesta de linfocitos T a la IL-2.

USO DE CORTICOIDES EN ENFERMEDADES NO ENDOCRINAS.

La utilización de corticoides en patologías no endocrinas se basa en aprovechar los efectos antiinflamatorios, antialérgicos, inmunosupresores y antineoplásicos de estas drogas.

Así su uso se indican en: reumatopatías y colagenopatías (lupus, vasculitis, artritis reumatoidea, dermatomiositis, esclerodermia, espondilitis anquilosante, síndrome de Sjögren). Enfermedades alérgicas y picadura de insectos; shock (anafiláctico y séptico), asma bronquial (en la crisis y como preventivo), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), dermatopatías de variada etiología (eczemas, urticarias, prurito, dermatitis exfoliativa, pénfigo, psoriasis); afecciones oculares (iritis, uveítis, corioretinitis, iridociclitis, conjuntivitis alérgica); inmunosupresión en transplantes; sarcoidosis; síndrome nefrótico; enfermedades neurológicas con componente autoinmune; hipercalcemia; como antineoplásico en leucemias; tratamiento coadyuvante de infecciones, procesos neoplásicos; traumatismos craneoencefálicos; prevención del síndrome de enfermedad respiratoria neonatal (SDRI).

En conclusión, por más de 60 años los corticoides han sido empleados para casi todas las patologías con resultados dispares. Debido a sus importantes acciones antiinflamatorias, su uso ha excedido el endocrino puro, y aunque una década después de su introducción ya se recomendaba cautela en su prescripción por la diversidad de efectos adversos que eran capaces de provocar, los corticoides entraron y se establecieron definitivamente en la práctica médica.

En la actualidad, gracias al importante aval científico y experiencia clínica acumulados puede lograrse su correcto uso (Serra et al., 2012).

HIPÓTESIS:

El tratamiento de ratones con artritis inducida por colágeno bovino tipo II (CIA) con células dendríticas (DCs) estimuladas por cortos periodos con LPS, en diversas formulaciones, y cargadas con colágeno tipo II, disminuye el daño en las articulaciones, reflejado en un menor score clínico y en análisis histopatológico.

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar morfológicamente los cambios producidos por los diversos tratamientos con células dendríticas en las diversas formulaciones, logrando así, definir el papel terapéutico que posee la administración de células dendríticas con fenotipo regulador en el modelo CIA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Describir microscópicamente con técnicas histológicas convencionales e histoquímicas los cambios morfológicos a nivel de las articulaciones en ratones inducidos con CIA en los distintos grupos y diferentes días de tratamientos y relacionar estos cambios con los indicadores macroscópicos de inflamación articular y número de articulaciones afectadas.

2. Evaluar en los distintos tiempos los diferentes tratamientos el daño del cartílago articular.

3. Evaluar en los distintos tiempos los diferentes tratamientos el grado de fibrosis en las articulaciones afectadas.

4. Relacionar los cambios histológicos con la evolución de la enfermedad en los distintos tratamientos en los diferentes días evaluados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales:

Se utilizaron ratones de la cepa DBA1/lacJ (H2q) procedentes de Jackson Laboratorios (Bar Harbor, ME, USA). Los animales fueron mantenidos en el Bioterio Central del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile bajo las normas bioéticas internacionales aceptadas.

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

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

Tratamiento previo con corticoides:

Se inyectó dexametasona (Sigma, St. Louis, CA, USA) diariamente intraperitonealmente (i.p) en dosis de 2mg/kg entre los días 29 a 34 post-inducción de CIA en los ratones.

Tratamiento con Células Dendríticas (DCs):

Células Dendríticas obtenidas de ratones DBA1/lacJ, de acuerdo a lo descrito por Salazar *et al.*, 2008, fueron cargadas con CII y posteriormente estimuladas con

lipopolisacárido (LPS) por 4 horas (4hLPS/CII/DCs) las que fueron inyectadas intraperitonealmente al día 35 post-inducción de CIA.

Muestras:

Se sacrificaron ratones mediante protocolo aprobado por el comité de bioética de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Chile, en diferentes días post-inoculación con CII para obtener muestras que se utilizaron para el análisis en histopatológico de tejido articular de las extremidades afectadas que presentaron el mayor índice artrítico (IA). Paralelamente se sacrificaron ratones sanos a utilizar como controles, siendo inoculados con solución salina (PBS).

Las mediciones se realizaron a nivel de cada articulación de las extremidades afectadas, es decir: articulaciones interfalángicas distal (IFD), interfalángicas proximal (IFP), metacarpo o metatarso falángicas (MC-F o MT-F), intercarpales o intertarsales (IC o IT).

Obtención del Índice Artrítico (IA):

Calculado de acuerdo a lo descrito por Yuasa *et al.* (1999), el que define una escala de 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 uno de los miembros anteriores y posteriores, con un máximo de 16 puntos.

Procesamiento de las muestras:

Todas las muestras obtenidas fueron fijadas por 24 horas en formalina al 10%. Posteriormente fueron decalcificadas en EDTA al 10% por 6 semanas. Luego se deshidrataron en alcoholes y aclaradas en xilol en un procesador automático de tejidos (Shandon, Citadle 2000, USA). Posteriormente las muestras fueron incluidas en parafina y cortadas en un micrótopo de rotación (Wetzlar, USA) a 4µm de grosor. Los cortes fueron montados en portaobjetos albuminados (López *et al.*, 1982). Por último, los cortes se desparafinaron y rehidrataron para aplicar las técnicas seleccionadas.

Análisis de las muestras:

Análisis histopatológico:

Con las muestras en las que se realizaron técnicas convencionales, se realizó un análisis descriptivo general de la membrana sinovial y del cartílago articular durante los distintos días de análisis y tratamiento utilizado. Realizando además las siguientes mediciones:

- Puntaje de daño histopatológico a nivel del cartílago articular:

Se realizó de acuerdo a lo 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.

- Grado de fibrosis:

Se diagnosticó según el número de capas de colágeno y el número promedio de focos de fibrosis, en 5 campos diferentes, clasificándose de la siguiente forma:

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).

Digitalización de imágenes:

Para calcular los resultados de las áreas de interés en los cortes utilizados para análisis histopatológico, se digitalizaron imágenes correspondientes a 5 campos tomados al azar, con aumento de 100X, a una resolución de 512 X 480 pixeles, mediante una videocámara digital (Cool Snap-Pro CF, Media Cybernetic, USA) montada en un microscopio óptico (Nikon Eclipse E-600) y conectada a una computadora que posee un software morfométrico (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, USA).

Análisis estadístico:

Los valores que se obtuvieron a lo largo del estudio con el tratamiento aplicado serán analizados mediante un “análisis de varianza” (ANDEVA), donde los factores que se evaluarán corresponden a:

- Factor inducción de la enfermedad: Con 6 niveles:

-CIA= animales inducidos con artritis.

-CIA+4hLPS/CII/DCs

- CIA+Dexametasona.

- CIA+Dexametasona+CII/DCs

- CIA+Dexametasona+4hLPS/DCs

- CIA+ Dexametasona+4hLPS/CII/DCs

- Factor tiempo: 47 y 70 días post-inducción CIA.

Las variables que mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) fueron comparadas con el test de rangos múltiples de Tukey (Steel y Torrie, 1980).

Se comparó el nivel de significancia entre los diferentes grupos utilizados en cada fecha, para lo cual se utilizó la prueba de Sheffé.

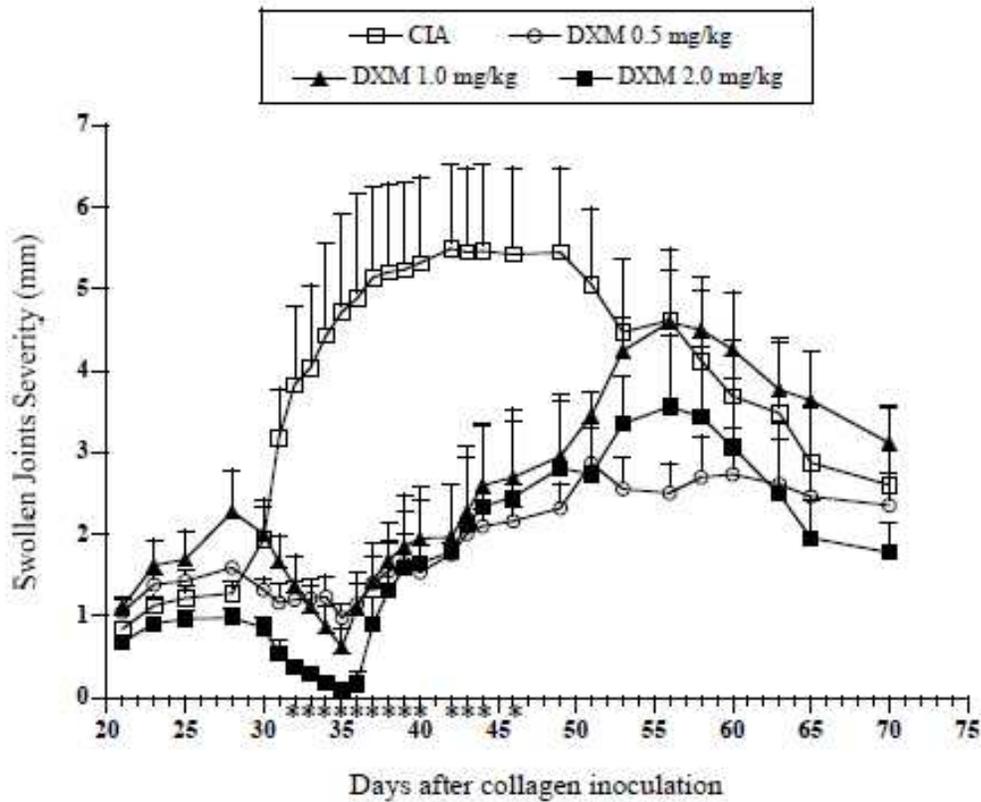
Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico SAS (2000).

RESULTADOS.

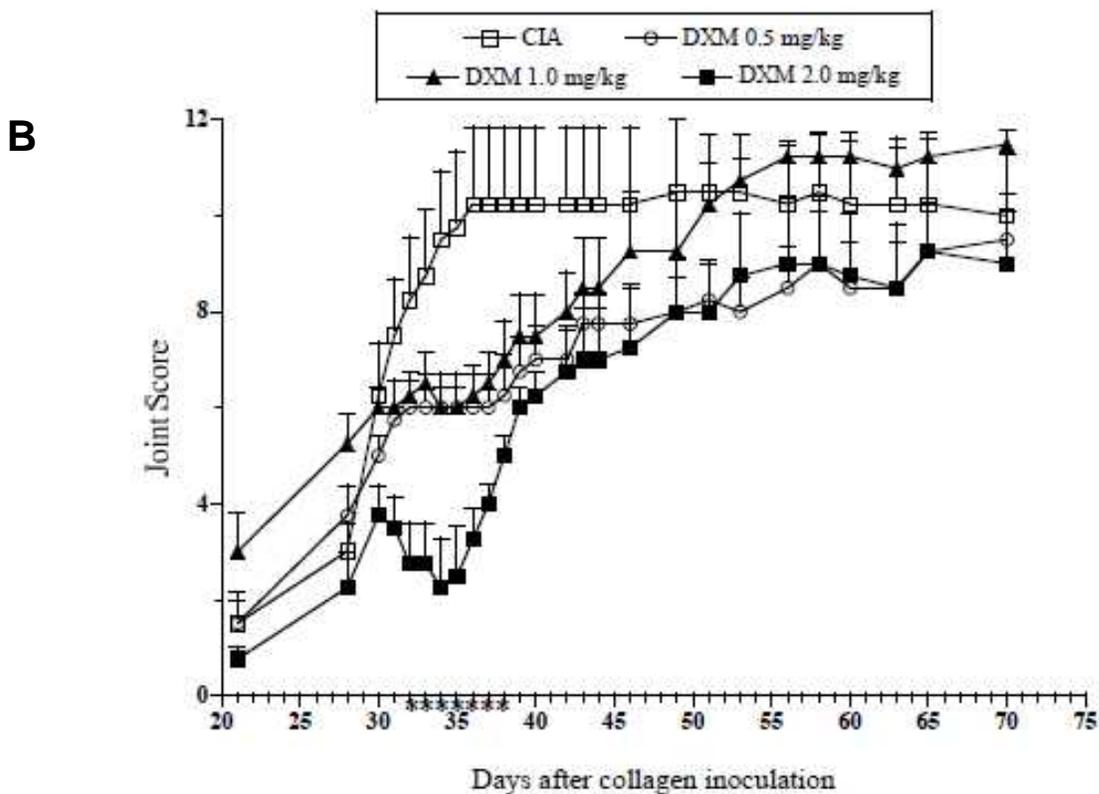
DETERMINACIÓN DOSIS DEXAMETASONA.

De acuerdo a los últimos avances en el tratamiento contra la AR referente a la utilización de DCs, se planteó combinar esta terapia con la administración de dexametasona, para lo cual se probaron distintas dosis hasta llegar a la más adecuada, tomando como parámetros de medición el indicador macroscópico de inflamación articular (Figura 1A) y número de articulaciones afectadas (Figura 1B).

A



*p<0,001



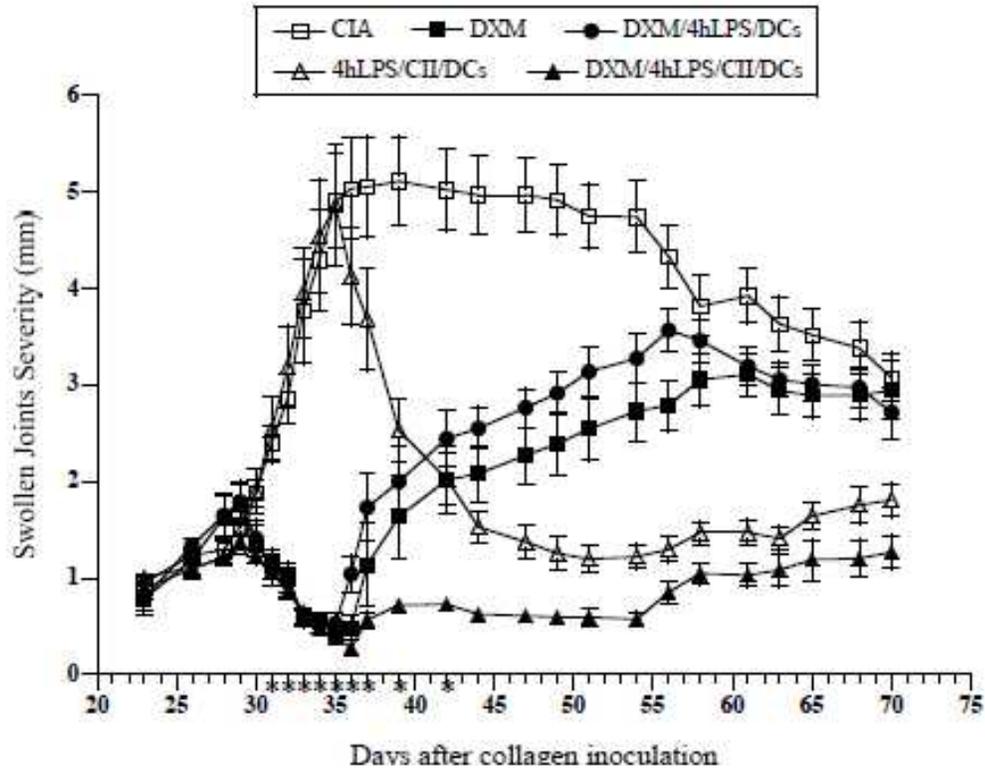
*p<0,001

Figura 1. Determinación de la dosis de dexametasona (DXM) óptima para interferir con la artritis murina inducida por colágeno (CIA) activa, en ratones DBA1/lacJ. Una vez que CIA se indujo con colágeno bovino tipo II, diferentes dosis de DXM (0,5; 1.0 y 2,0 mg/kg de peso) se administraron intraperitonealmente a los días 29 a 34 de iniciado el proceso autoinmune. A) El indicador macroscópico de inflamación articular (Swollen Joint Severity) y B) el número de articulaciones afectadas (Joint Score) se midieron hasta el día 70.

Se logró determinar que la dosis adecuada de dexametasona corresponde a 2mg/kg para complementar el tratamiento con DCs, esto debido a la disminución de las pendientes de las curvas de Swollen Joints Severity y Joint Score. Posteriormente se procedió a inocular a los ratones con CIA entre los días 29 y 34 post inducción de CIA con la dosis determinada de dexametasona y seguir con el tratamiento con DCs con el protocolo propuesto desde el inicio del estudio. Los resultados obtenidos se reflejan en el indicador macroscópico de inflamación

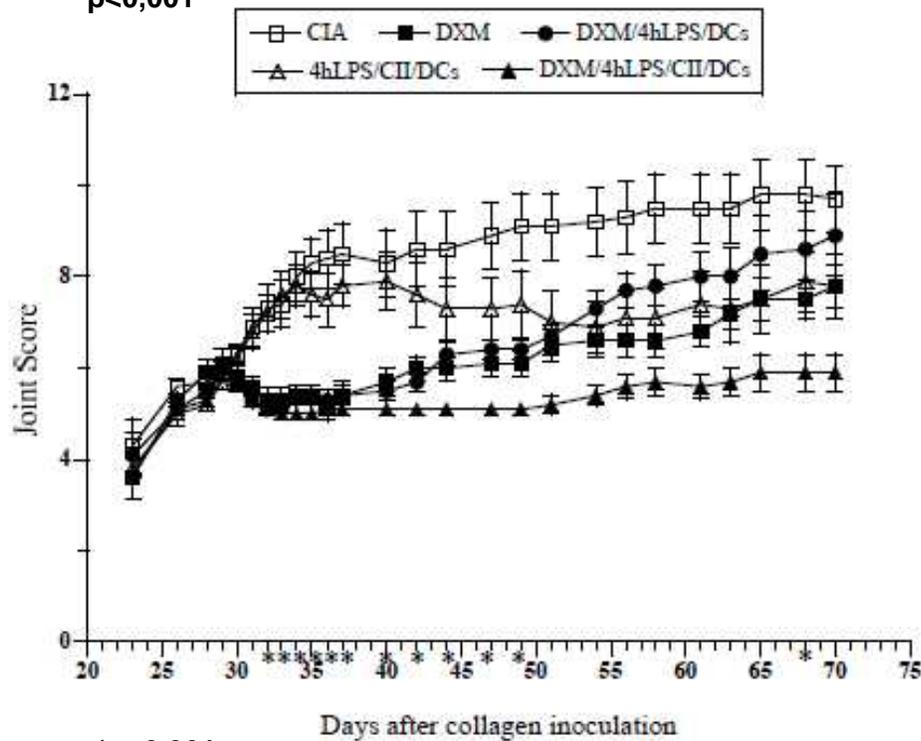
articular que se muestra en la Figura 2A y en el número de articulaciones afectadas representado en la Figura 2B.

A



*p<0,001

B

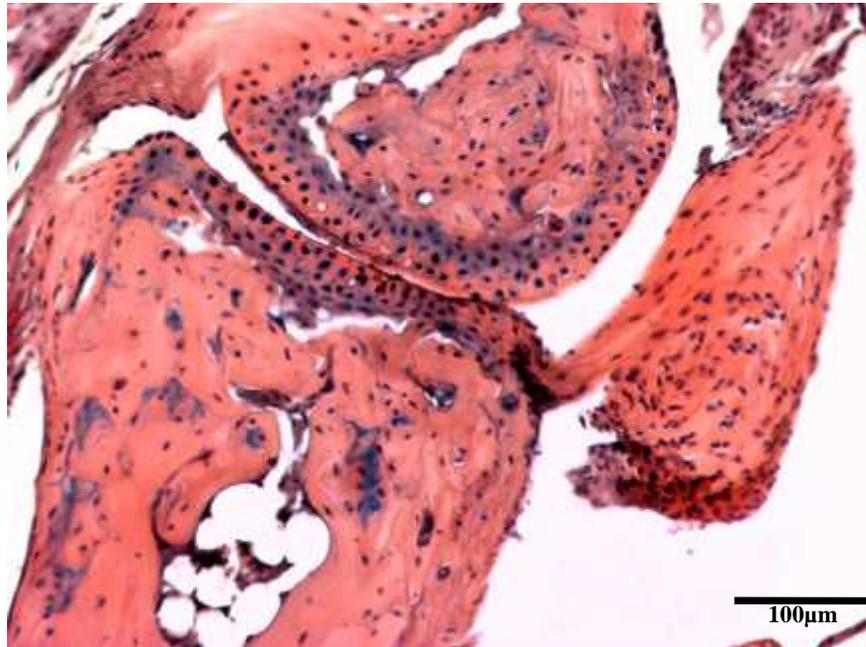


*p<0,001

Figura 2. El pre-tratamiento con dexametasona (DXM) mejora la modulación de artritis murina inducida por colágeno (CIA) activa proporcionada por la inoculación de células dendríticas (DCs) estimuladas por 4 horas con lipopolisacárido (LPS) y pulsadas con colágeno bovino tipo II (CII), en ratones DBA1/lacJ. Ratones con CIA activa recibieron pre-tratamiento con DXM de 2,0 mg/kg de peso, y luego al día 35 de inducida CIA, fueron inoculados intraperitonealmente con 5×10^5 de DCs, de acuerdo a lo siguiente: CIA/DXM, ratones controles con CIA que recibieron sólo DXM; CIA/DXM/4hLPS/CII/DCs, ratones que recibieron DXM y DCs estimuladas con LPS por 4 horas y pulsadas con CII; CIA/DXM/4hLPS/DCs; ratones que recibieron DXM y DCs estimuladas con LPS por 4 horas y no pulsadas con CII; CIA/4hLPS/CII, ratones que recibieron sólo DCs estimuladas con LPS por 4 horas y pulsadas con CII. CIA/Agua Bidestilada correspondió a un grupo control del experimento. Datos representativos de 3 experimentos con n=8-10 ratones por grupo. A) El indicador macroscópico de inflamación articular (Swollen Joint Severity) y B) el número de articulaciones afectadas (Joint Score) se midieron hasta el día 70.

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.

Al observar las muestras histológicas de los distintos grupos de tratamiento, se observan grandes diferencias morfológicas entre ellos. Es así, que el grupo control (CIA+Agua) presentó los mayores cambios a nivel de la membrana sinovial, observándose una progresiva infiltración de células inflamatorias, además de aumento en el número de células sinoviales se observa una fibrosis marcada. Dentro de otros cambios, es notorio el daño a nivel del cartílago articular, observando en algunos casos pérdida o hipertrofia de condrocitos. A medida que la enfermedad se hace crónica se agrega la aparición del pannus que invade el cartílago y posteriormente lo destruye siendo muy notorios los cambios al observar un corte histológico de una articulación sinovial de un ratón sano, donde es posible observar la disposición conservada de los condrocitos del cartílago hialino articular, formando tres capas que se diferencian por la disposición de estos, una conservada cavidad y membrana sinovial.



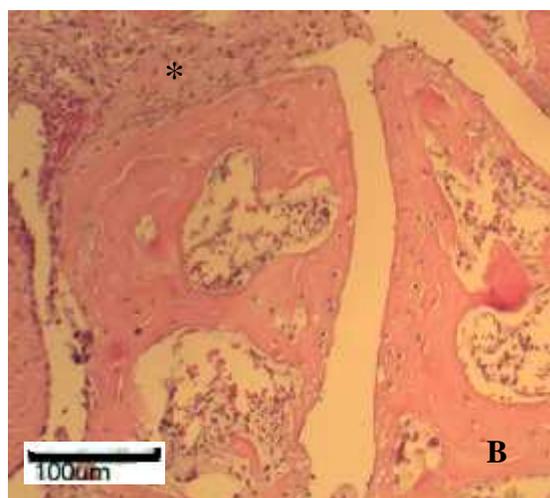
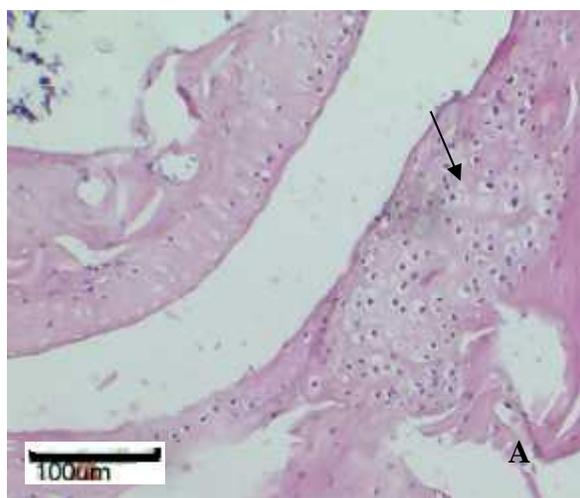
Corte histológico de articulación sinovial normal H-E (100x). Se observa la conservación del cartílago hialino articular, cavidad y membrana sinovial sin alteraciones morfológicas.

En el análisis histopatológico, es posible observar que el factor tiempo es clave en el desarrollo de la enfermedad, ya que en días más avanzados de la inoculación de CIA (se compara día 47 y 70 post-inoculación) se nota un mayor daño en las articulaciones estudiadas a nivel de todos los grupos experimentales, lo que se puede observar en la Tabla 1. En el día 47 los distintos grupos presentan un menor daño ya que existe una transición de la etapa aguda de la enfermedad a la etapa crónica, representada por el día 70 donde es visible el gran daño articular, a excepción del grupo pre-tratado con Dexametasona y posteriormente inoculación de células dendríticas semi- maduras cargadas con colágeno bovino tipo II (CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs) (figuras K y L). Un resultado similar, pero donde es posible observar algún tipo de daño aunque menor, refiriéndose a mínima erosión cartilaginosa y pérdida en algunas regiones de la cavidad sinovial es lo que ocurre en el grupo CIA+4hLPS/CII/DCs (figuras G y H).

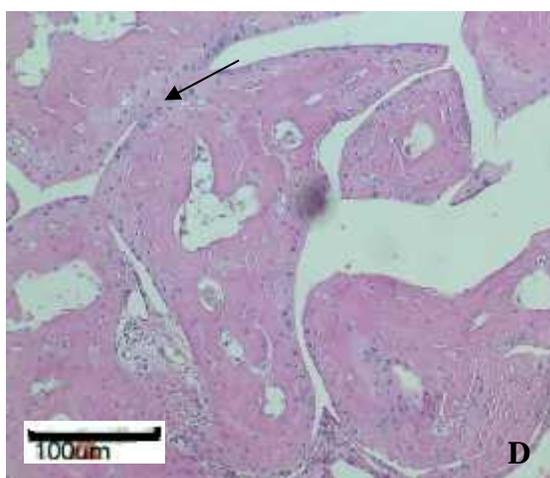
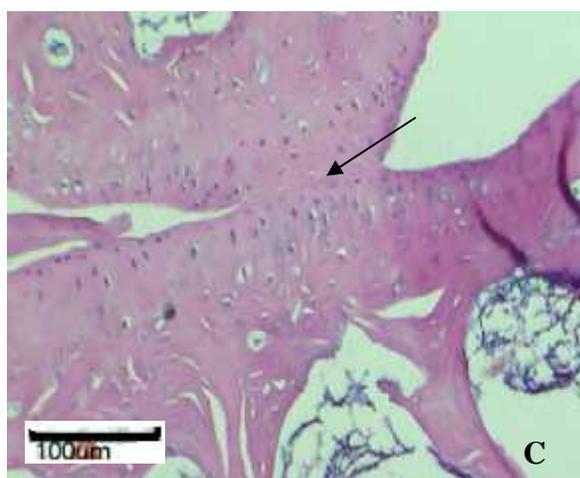
DÍA 47

DÍA 70

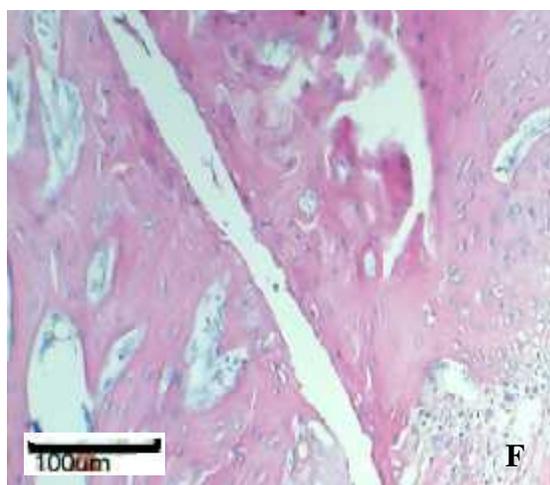
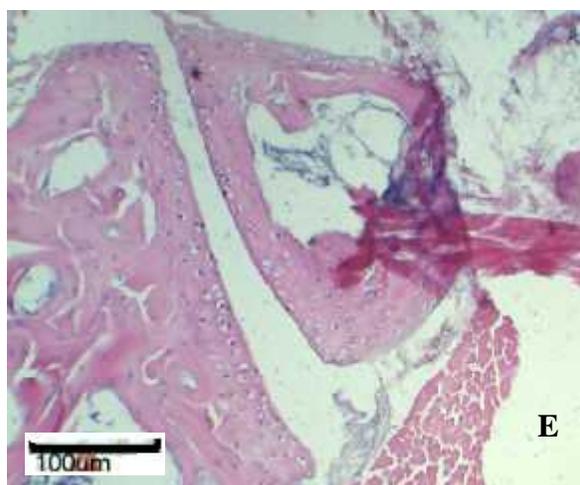
CIA+AGUA



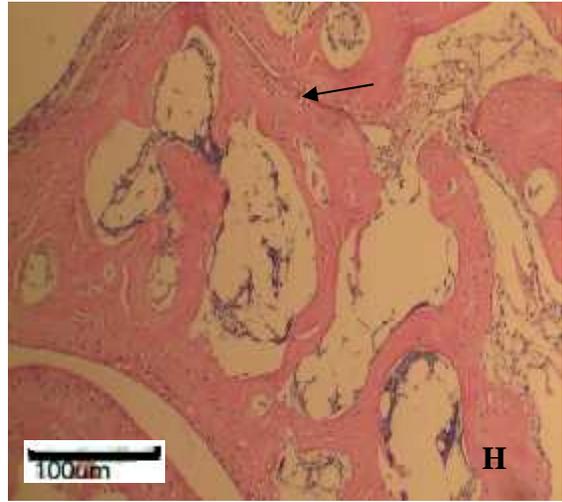
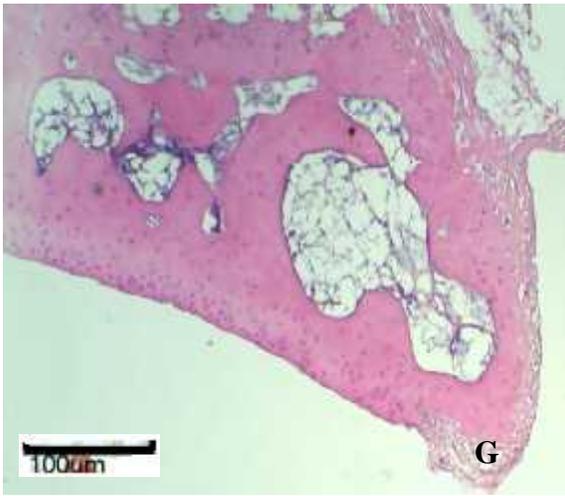
CIA+DEXA



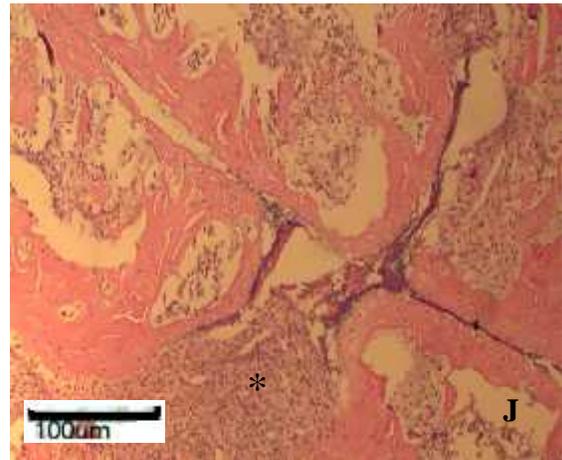
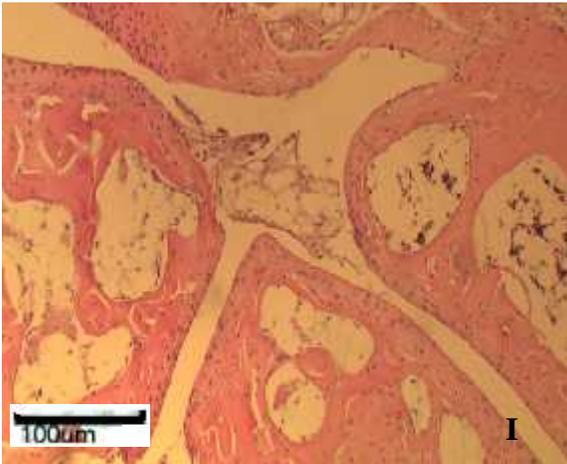
CIA+DEXA/
CII/DCs



CIA+4hLPS/
CII/DCs



CIA+DEXA+
4hLPS/DCs



CIA+DEXA+
4hLPS/CII/DCs

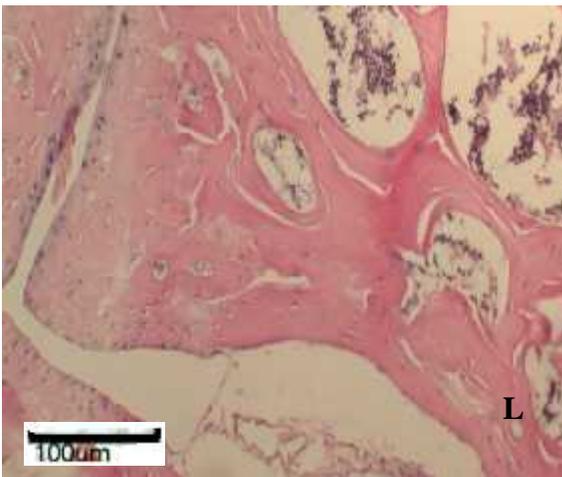
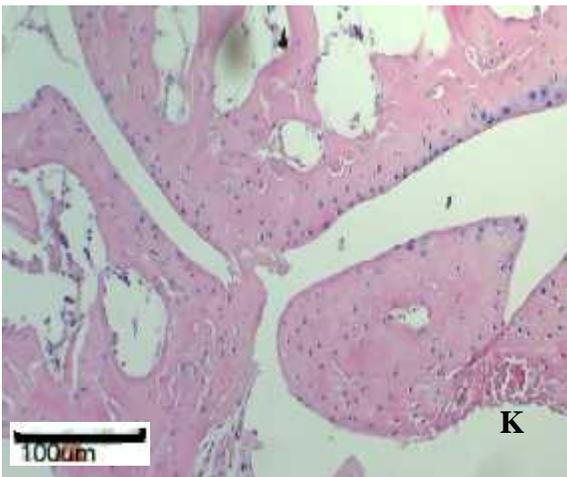
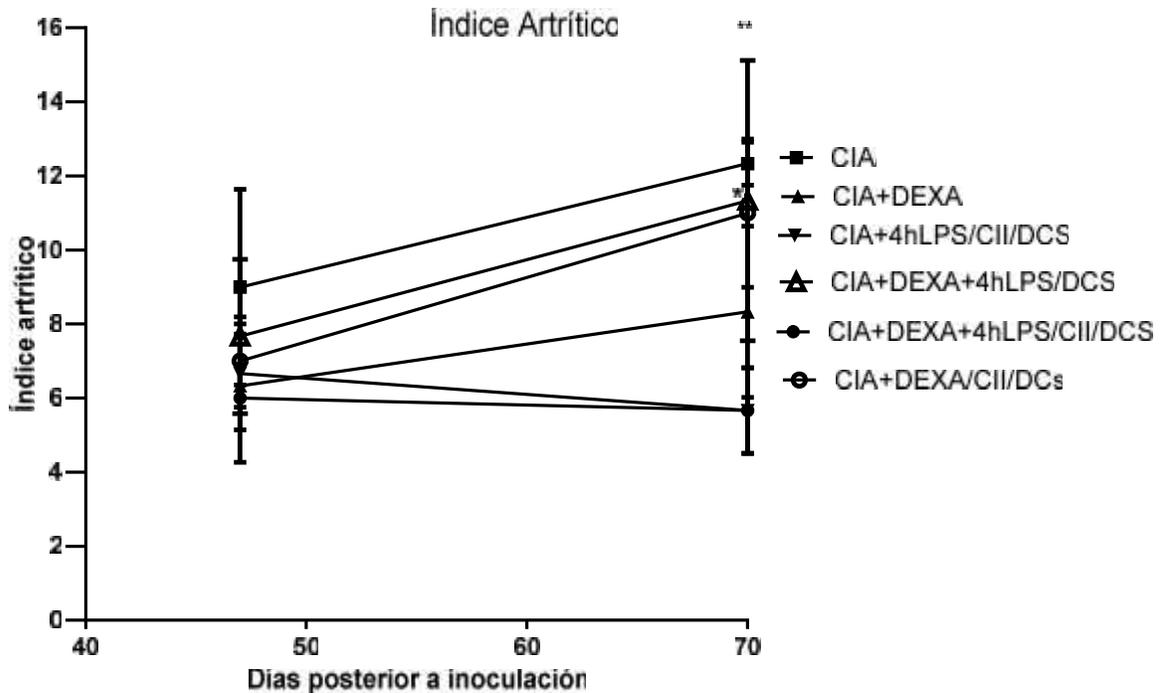


TABLA N°1: ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE ARTICULACIONES. Se observan cortes de los distintos grupos de estudio en los días 47 y 70 post-inoculación. En el grupo CIA+AGUA es posible observar en la figura A, hiperplasia de condrocitos en el cartílago articular (flecha). Existe formación de pannus (*) en figuras B, D y J correspondientes a los grupos CIA+AGUA, CIA+DEXA y CIA+DEXA+4hLPS/DCs respectivamente que comparten el día 70 post-inoculación. En figuras C (CIA+DEXA día 47) y D (CIA+DEXA día 70) se aprecia la pérdida de la cavidad sinovial (flecha). En las figuras B (CIA+AGUA día 70), F (CIA+DEXA/CII/DCs día 70) G (CIA+4hLPS/CII/DCs día 47) y J (CIA+DEXA+4hLPS/DCs día 70) se observa erosión del cartílago articular con uno o varios focos de pérdida de condrocitos (). H-E 100x.

ÍNDICE ARTRÍTICO.

En el gráfico se muestran los valores obtenidos de índice artrítico (IA) para los días 47 y 70 post-inducción CIA en los distintos grupos, se puede observar que el IA se incrementa a medida que transcurren los días post-inoculación colágeno bovino tipo II, en la mayoría de los grupos, a excepción de CIA+4hLPS/CII/DCs y CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCS.

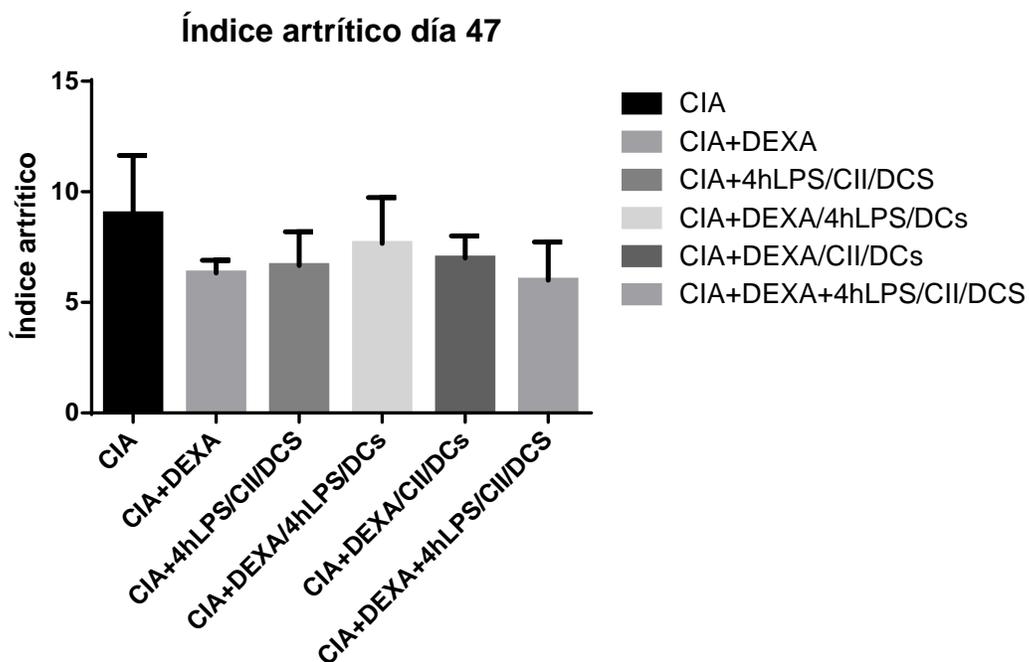
Índice artrítico (IA) en los distintos tratamientos.



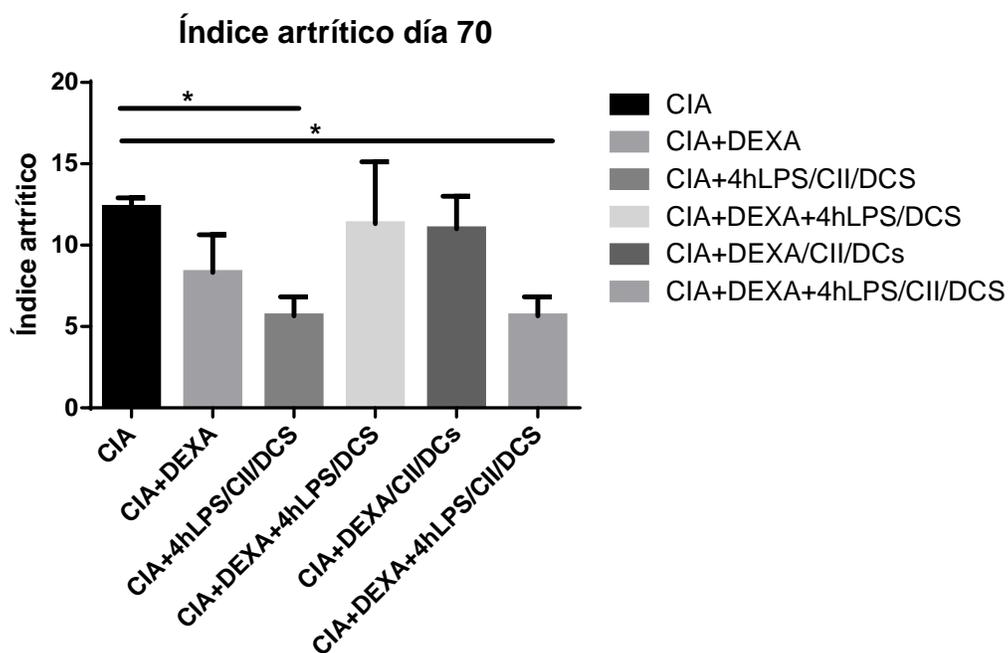
*P≤0,05

**P≤0,005

ÍNDICE ARTRÍTICO. Se observa que el grupo que presenta mayor índice artrítico corresponde al grupo considerado control (CIA), que es lo esperado ya que la enfermedad sigue su curso normal, mientras que el uso de la Dexametasona inyectada intraperitonealmente durante los días 29 a 34 post-inoculación CIA presenta un índice artrítico menor que el resto de los grupos. Esta situación aún mejora cuando el pre-tratamiento con dexametasona se combina con la inoculación de células dendríticas semi-maduras inyectadas con colágeno tipo II (grupo CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs) que presenta el menor índice artrítico tanto en el día 47 y 70 del estudio.

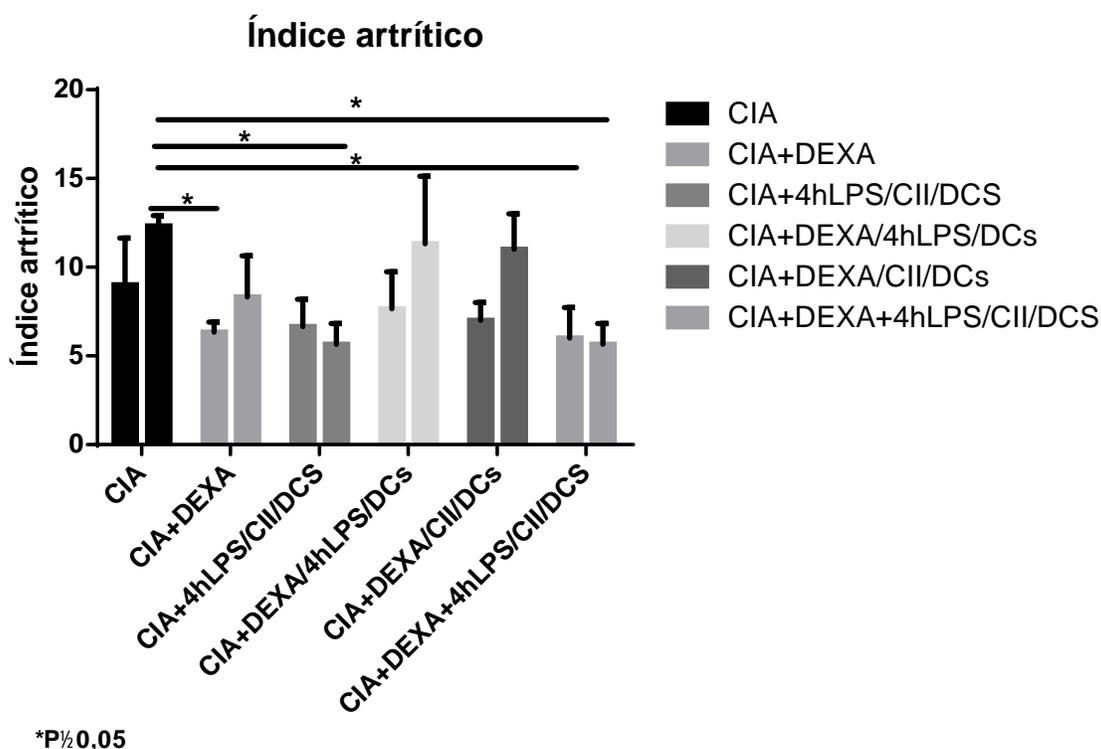


ÍNDICE ATRÍTICO DÍA 47: Se observa que al día 47 post-inducción de CIA un mayor índice artrítico en el grupo CIA, siendo menor en el grupo pre-tratado con dexametasona y posterior inoculación de DCs semi-maduras. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio en el día 47.



*P<0,05

ÍNDICE ARTRÍTICO DÍA 70: Se observa que al día 70 post-inducción de CIA el grupo CIA muestra el mayor índice, seguido por los grupos CIA+DEXA+4hLPS/DCs y CIA+DEXA/CII/DCs. Al contrario, el menor índice lo presenta el grupo con el pre-tratamiento con dexametasona y posterior inoculación de DCs semi-maduras. Se muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CIA y CIA+4hLPS/CII/DCs; CIA y CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs (*p 0,05).



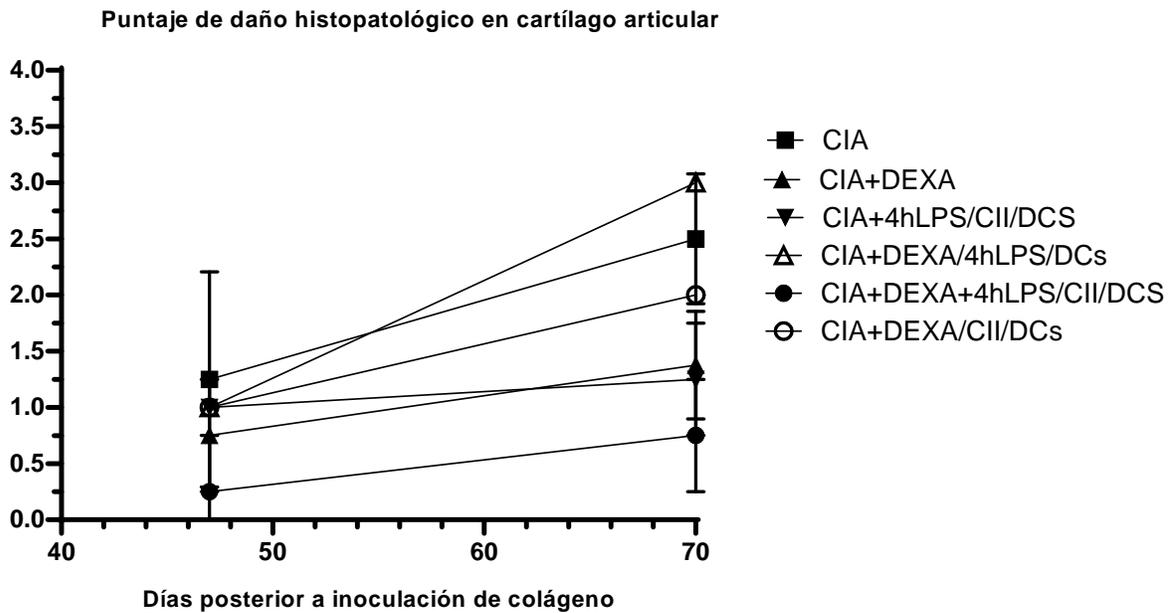
ÍNDICE ARTRÍTICO DÍAS 47 Y 70: Se observa que el mayor índice en ambos días de muestreo lo tiene el grupo CIA, precedido del grupo CIA+DEXA/4hLPS/DCs, mientras que los menores índices en ambas fechas lo presenta el grupo CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs. Hay diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos en los distintos días de muestreo, es así en CIA día 70 y CIA+DEXA día 47; CIA día 70 y

CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs día 47 (p 0,05). (Cada color representa un grupo de estudio, la barra de la izquierda en cada grupo corresponde al día 47 y la barra de la derecha al día 70 post-inducción CIA).

PUNTAJE DE DAÑO HISTOPATOLÓGICO A NIVEL DE CARTÍLAGO ARTICULAR.

Se representan los distintos puntajes obtenidos al realizar el análisis histopatológico de los distintos grupos en estudio.

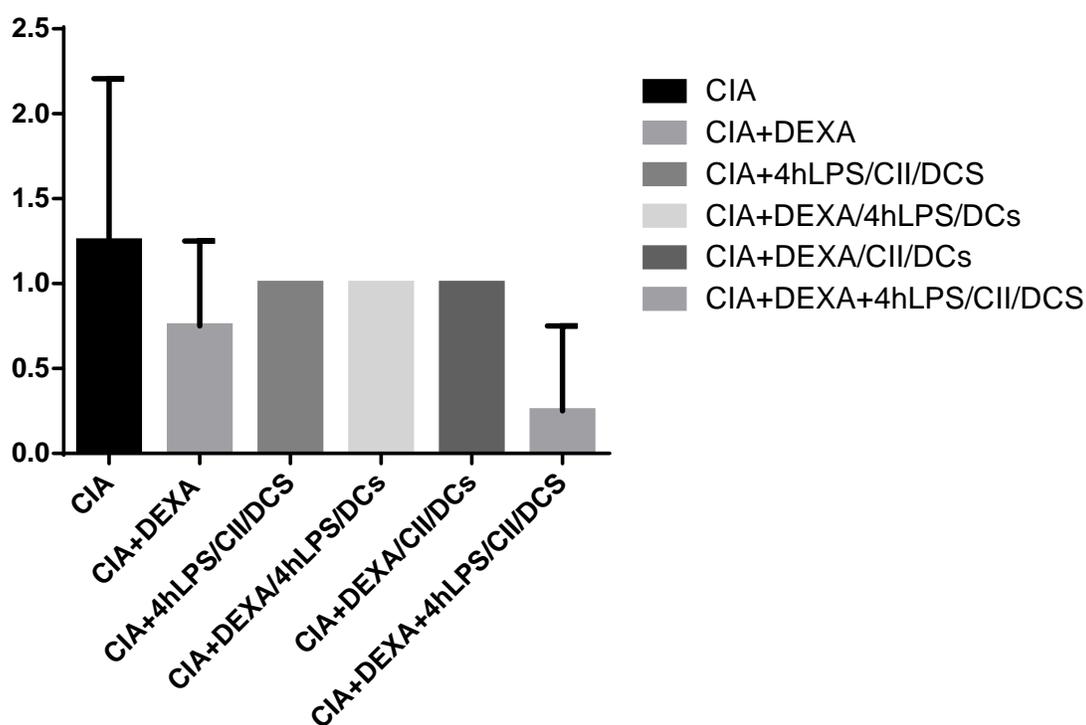
DAÑO HISTOPATOLÓGICO CARTÍLAGO ARTICULAR



DAÑO HISTOPATOLÓGICO CARTÍLAGO ARTICULAR: Se puede observar que el mayor puntaje del cartílago articular al día 47 post-inducción CIA lo muestra el grupo CIA, mientras que al día70, el mayor puntaje lo presenta el grupo CIA+DEXA/4hLPS/DCs. El menor puntaje

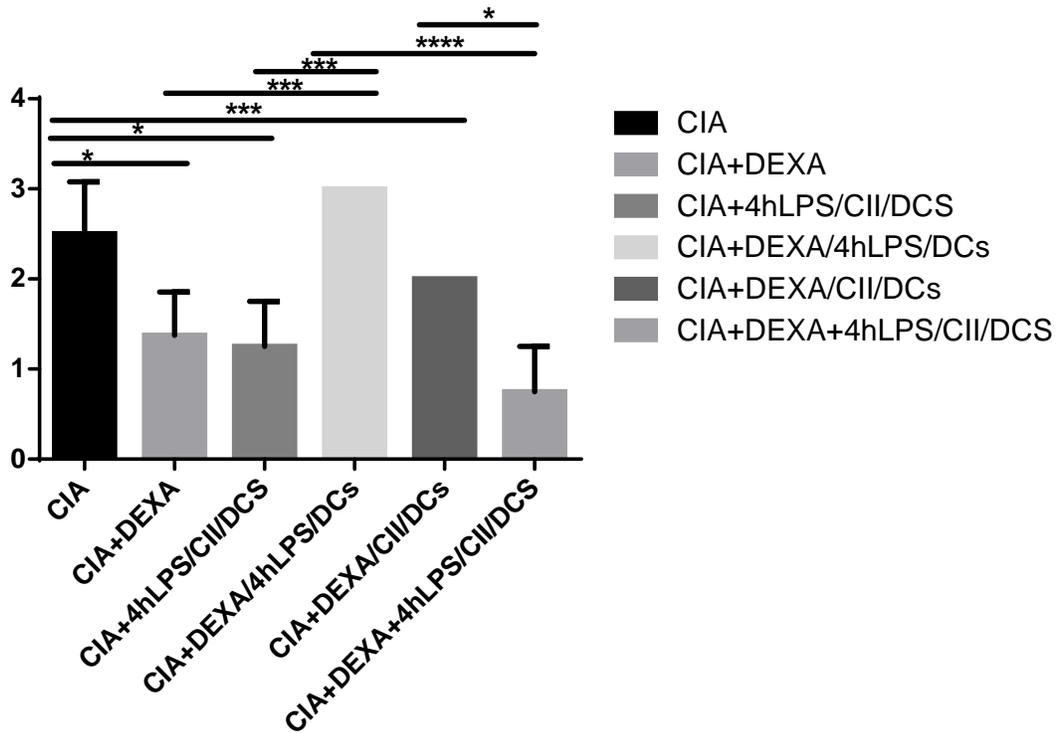
tanto al día 47 y 70 lo muestra el grupo pre-tratado con dexametasona y posterior inoculación de células dendríticas semi-maduras.

Daño histopatológico cartílago articular día 47



DAÑO HISTOPATOLÓGICO CARTÍLAGO ARTICULAR DÍA 47: Es posible distinguir que el grupo que posee un mayor daño en el cartílago articular es el grupo CIA, mientras que el menor índice lo representa al grupo CIA+DEXA +4hLPS/CII/DCs. Los grupos CIA+4hLPS/CII/DCs, CIA+DEXA/4hLPS/DCs y CIA+DEXA/CII/DCs presentan un mismo puntaje de daño de cartílago articular, mostrando en este caso un efecto de mejoría en aquel grupo en que CIA fue tratada con dexametasona. (No existen diferencias estadísticamente significativas en los distintos grupos de estudio al día 47 post-inducción CIA).

Daño histopatológico cartílago articular día 70

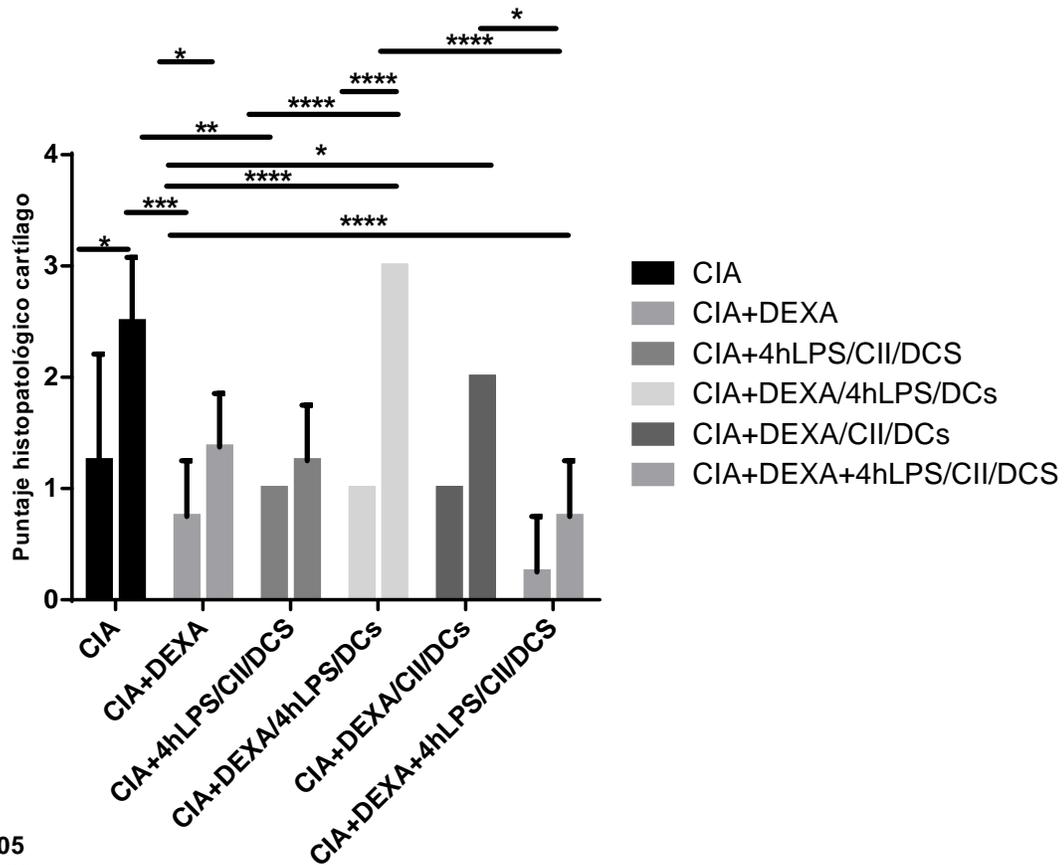


*P½0,05
 ***P½0,001
 ****P½0,0001

DAÑO HISTOPATOLÓGICO CARTÍLAGO ARTICULAR DÍA 70: Se puede reconocer que al día 70 post-inducción CIA hay un cambio en los grupos de tratamiento referente a lo observado al día 47, esto se refleja en que el grupo que presenta un puntaje de daño de cartílago articular mayor en este día de estudio corresponde al grupo CIA+DEXA/4hLPS/DCs mientras que al día 47 es el grupo CIA. El grupo que presenta un menor daño en el cartílago articular al día 70 es el grupo pre-tratado con dexametasona y posterior inoculación de células dendríticas semi-maduras (CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs). Es posible distinguir diferencias estadísticamente significativas entre los grupos: CIA y CIA+DEXA; CIA y CIA+4hLPS/CII/DCs; CIA y CIA+DEXA/CII/DCs. También entre los grupos: CIA+DEXA y CIA+DEXA/4hLPS/DCs; CIA+4hLPS/CII/DCs y CIA+DEXA/4hLPS/DCs;

CIA+DEXA/4hLPS/DCs y CIA+DEXA/4hLPS/CII/DCs; CIA+DEXA/CII/DCs y CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs (*p 0,05, ***p 0,001 y ****p 0,0001).

Daño histopatológico cartílago articular

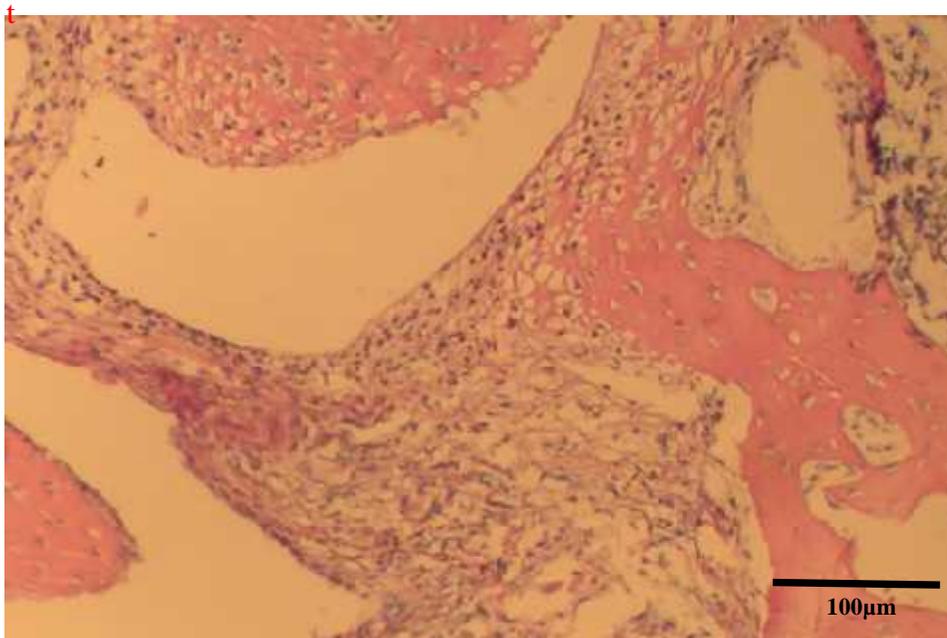


*P½0,05
 **P½0,005
 ***P½0,001
 ****P½0,0001

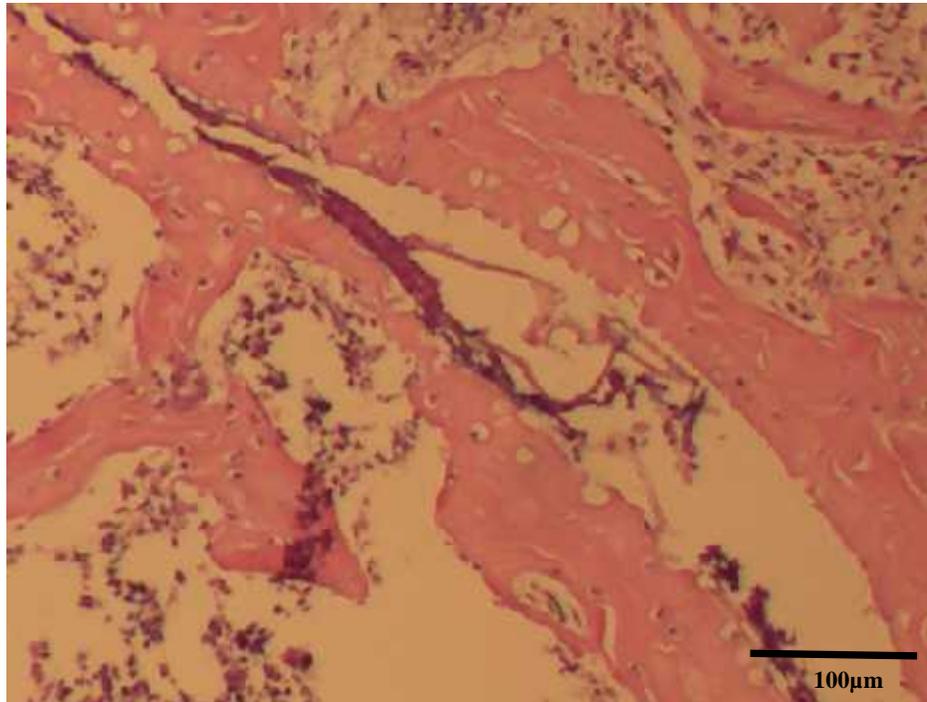
DAÑO HISTOPATOLÓGICO CARTÍLAGO ARTICULAR DÍAS 47 Y 70: Se observa que al día 47 el mayor puntaje de daño del cartílago articular lo presenta el grupo CIA, mientras que en una etapa más crónica de la enfermedad (día 70) el mayor puntaje lo presenta el grupo CIA+DEXA/4hLPS/DCs corroborando que el tratamiento es antígeno-específico, ya que en los dos días de muestreo de este estudio los menores puntajes de daño de cartílago articular lo presenta el grupo CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs donde está presente el antígeno que es el colágeno tipo II (CII) bovino. (Cada color representa un grupo de estudio, la barra de la

izquierda en cada grupo corresponde al día 47 y la barra de la derecha al día 70 post-inducción CIA). Diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos de estudio al día 47 al comparar con el resto de los grupos al día 70 post-inducción de CIA (*p 0.05, **p 0.005, ***p 0.001 y ****p 0.0001).

A partir de los distintos grupos en los diferentes días de estudio es posible observar que en el grupo CIA+AGUA al día 47 se observan algunos focos de pérdida de condrocitos. En el caso del grupo CIA+DEXA+4hLPS/DCs se observa una mayor cantidad de focos de pérdida de condrocitos al avanzar en la etapa crónica de la enfermedad.



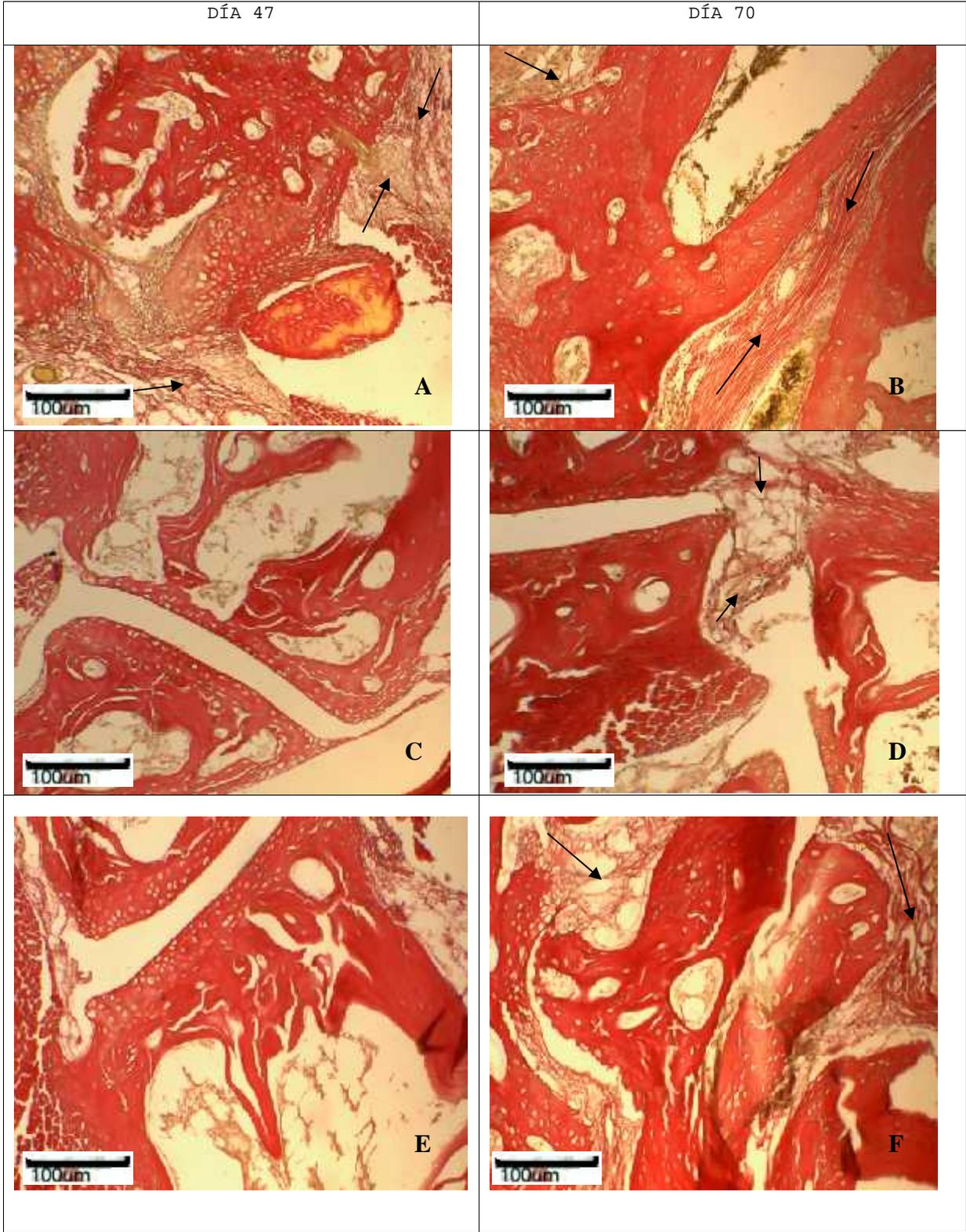
ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE DAÑO DE CARTÍLAGO ARTICULAR. Fotografía de cartílago articular de ratón de grupo CIA+AGUA al día 47 post-inoculación (100x) H-E. Se observan focos de pérdida de condrocitos ().



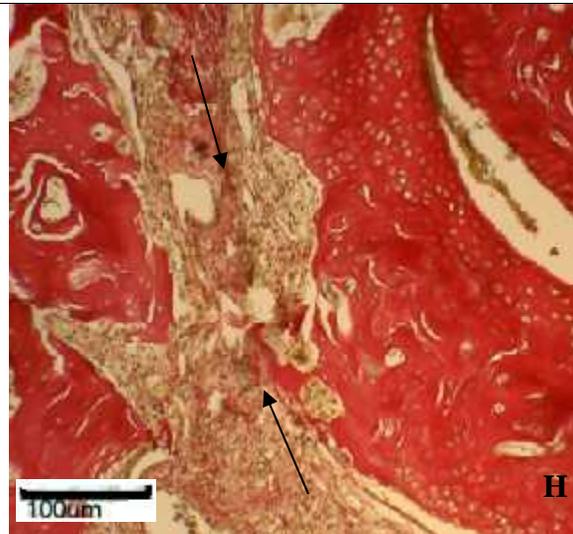
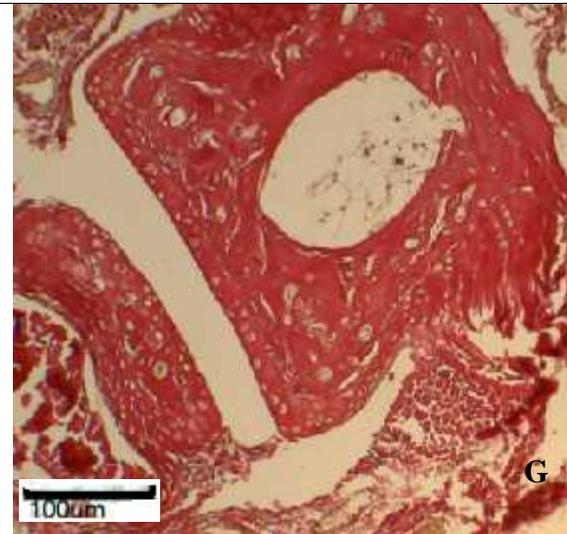
ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE DAÑO DE CARTÍLAGO ARTICULAR: El grupo CIA+DEXA+4hLPS/DCs al día 70 post-inoculación (100x) H-E. Se observan focos de pérdida de condrocitos ().

FIBROSIS:

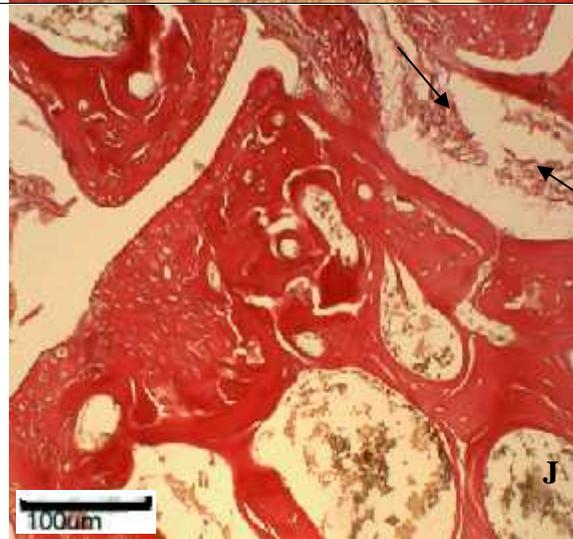
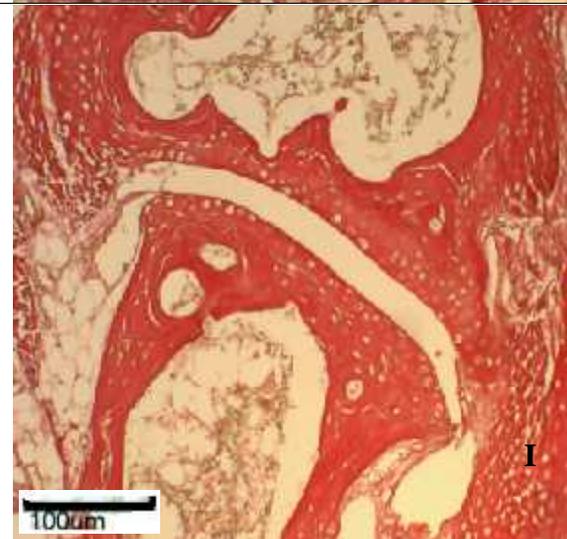
El grado de fibrosis se observó a través de la técnica histoquímica de Van Gieson, dando los siguientes resultados: el colágeno se observa de color rojo, núcleos celulares de color marrón a negro y fibras musculares y citoplasma de color amarillo lo que se puede observar en la tabla número 2.



CIA+DEXA+
4hLPS/DCs



CIA+4hLPS/
CII/DCs



CIA+DEXA+
4hLPS/CII/DCs

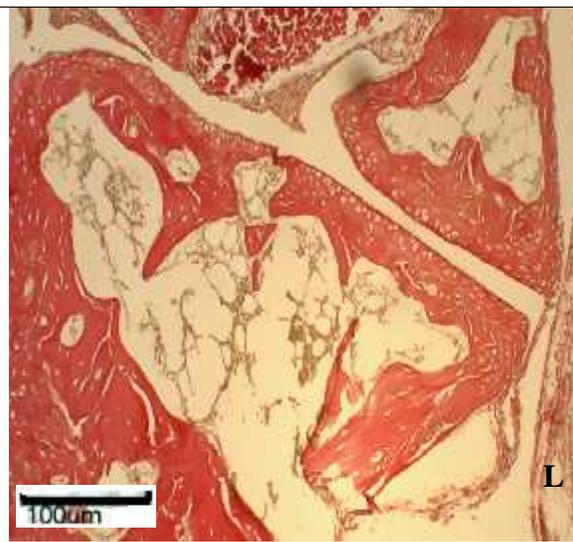
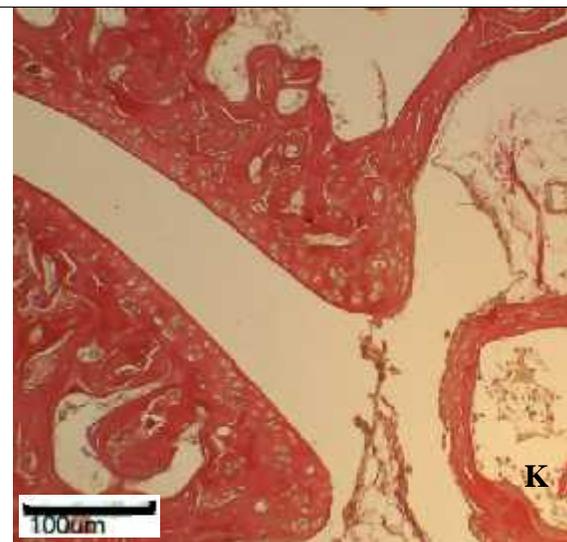
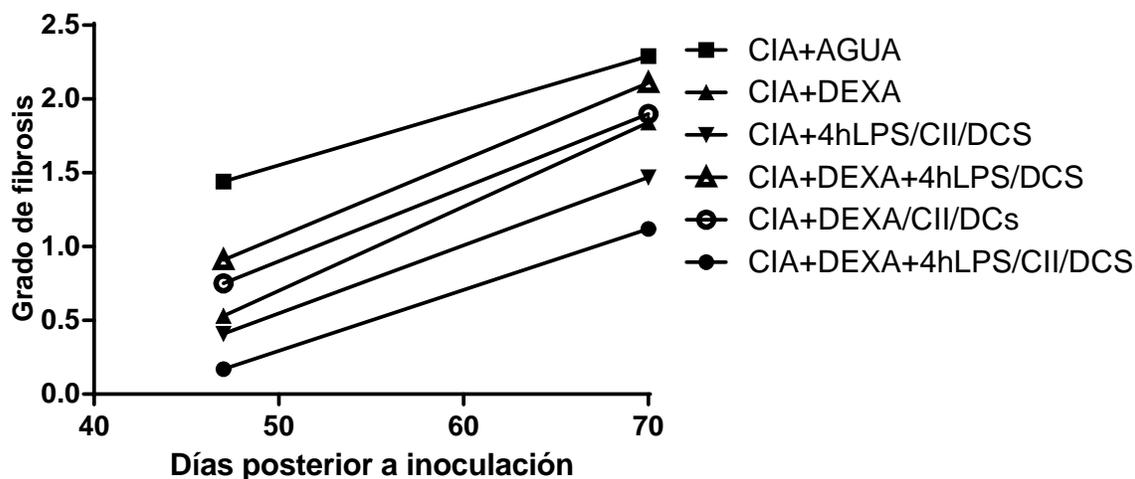


TABLA N° 2: ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE GRADO DE FIBROSIS EN

ARTICULACIONES: Se observa la presencia de fibrosis (flechas) que se presentan formando capas (rango de 1 a 10) y focos de fibrosis (rango 2 a 5). El análisis histológico permite señalar que en el grupo CIA +AGUA se observa fibrosis desde el día 47 (Figura A) que se acentúa al día 70 (Figura B) donde se pueden apreciar las capas de colágeno (flechas) características de la fase crónica de la enfermedad, seguida por el grupo CIA+DEXA/4hLPS/DCs que al día 70 presenta una gran fibrosis (Figura H). Mientras que el grupo CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs no muestra presencia de fibrosis en los días de estudio (Figuras K y L). En el grupo CIA+DEXA no se observa fibrosis al día 47 (Figura C) y es posible observar escasa fibrosis al día 70 (Figura D).

GRADO DE FIBROSIS

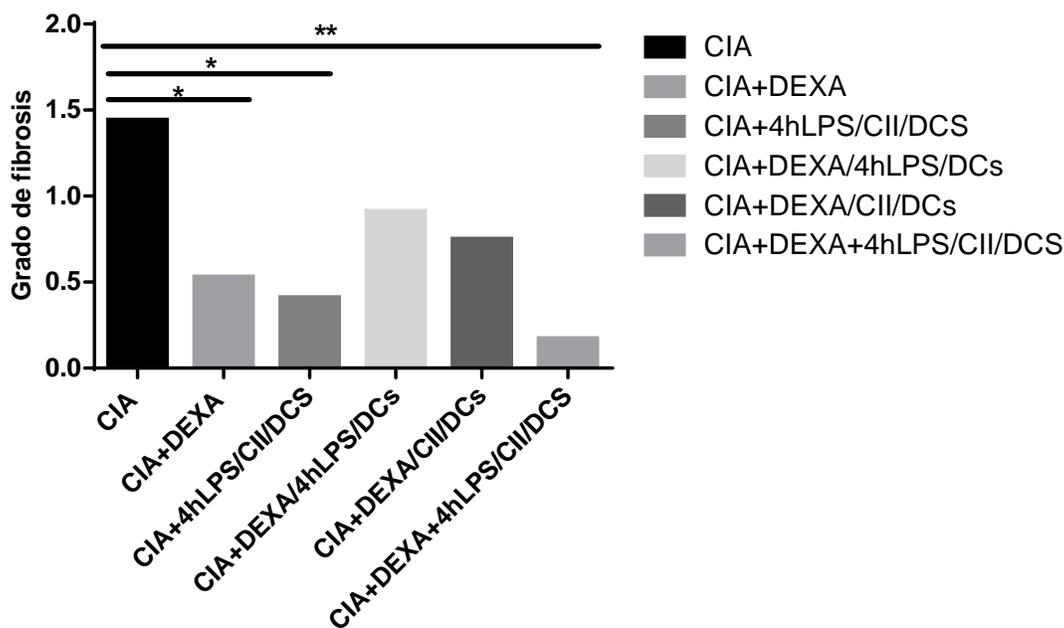
Grado de fibrosis



*P≤0,05

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE GRÁDO DE FIBROSIS EN ARTICULACIONES. Se puede apreciar que el grado de fibrosis aumenta a medida que avanza el transcurso de la enfermedad hacia una etapa crónica lo que se observa claramente en el grupo CIA+AGUA, mientras que en los grupos que recibieron dexametasona, previo a la aplicación de 4HLPS/CII/DCs aumentó el grado de fibrosis, pero en niveles que fueron levemente superiores que el índice 1 de fibrosis (con un máximo posible de 3).

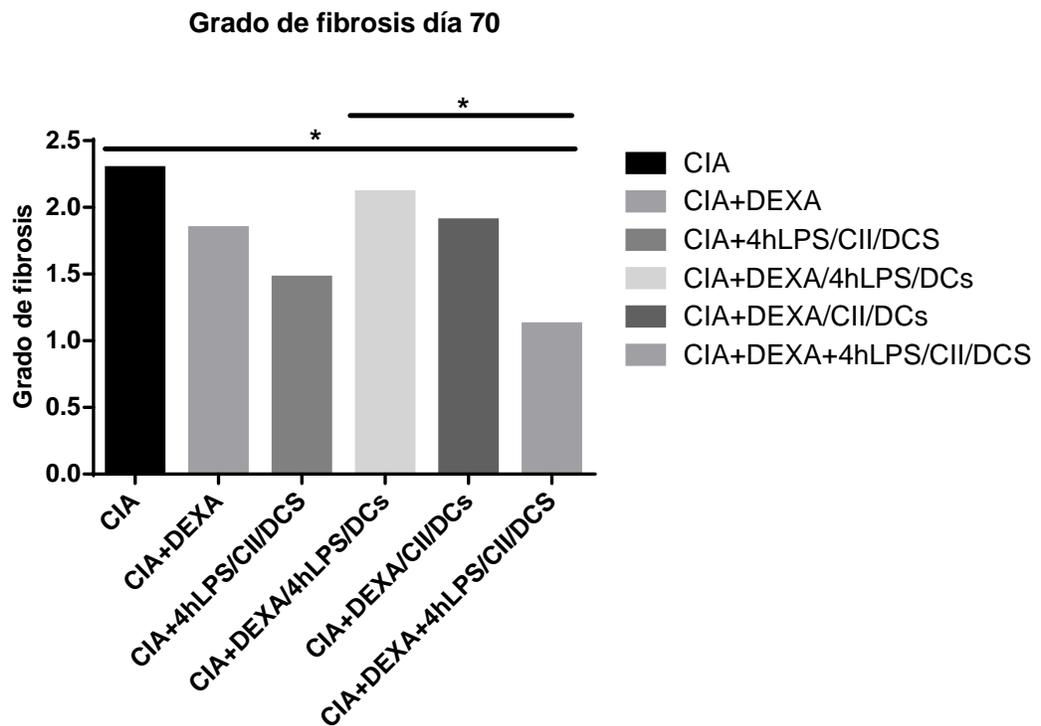
Grado de fibrosis día 47



*P½0,05
 **P½0,005

GRADO DE FIBROSIS DÍA 47: Se observa un mayor grado de fibrosis al día 47 post-inducción el grupo CIA, seguido del grupo CIA+DEXA/4hLPS/DCs, a pesar de administraron células dendríticas a este grupo y previo pre-tratamiento con dexametasona, lo que indica que el tratamiento con DCs es antígeno específica; el menor grado corresponde al grupo

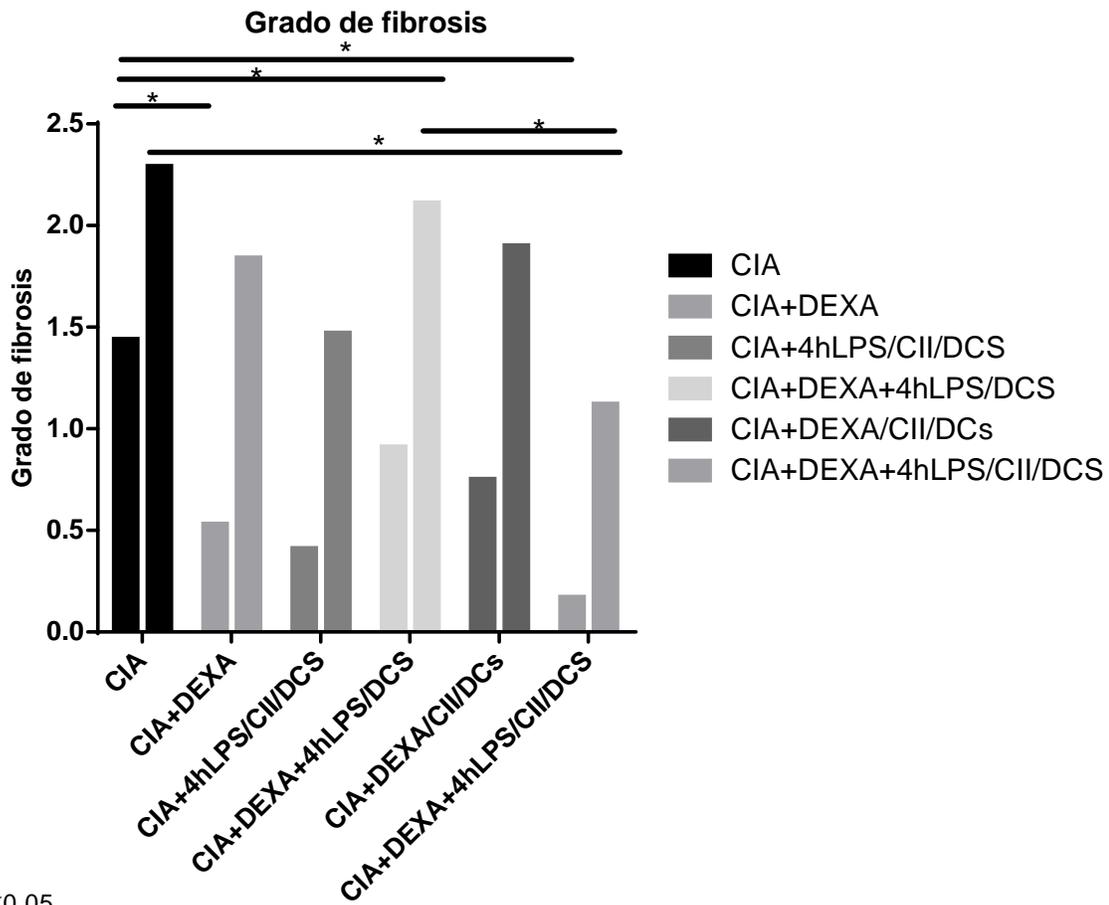
CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs. Hay diferencias estadísticamente significativas en este día de muestreo a diferencia de los parámetros medidos anteriormente donde no se evidencian diferencias estadísticamente significativas en este día. Las diferencias se muestran entre los grupos CIA y CIA+DEXA; CIA y CIA+4hLPS/CII/DCs (*p 0.05) y CIA y CIA+DEXA+4HLPS/CII/DCs (**p 0.005).



*P½0,05

GRADO DE FIBROSIS DÍA 70: Se observa un aumento del grado de fibrosis en los distintos grupos de tratamiento, manteniendo el mayor indicador de fibrosis el grupo CIA, seguido del grupo CIA+DEXA/4hLPS/DCs, mientras que el menor grado de fibrosis lo presenta el grupo CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs, por lo cual con estos datos se evidencia que el tratamiento es antígeno específico, es decir actúa en este caso contra el colágeno tipo II (CII) bovino. Hay

diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CIA y CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs; CIA+DEXA/4hLPS/DCs y CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs (*p 0.05).



GRADO DE FIBROSIS DÍAS 47 y 70: Se observa que en todos los grupos de estudio existe un aumento del grado de fibrosis desde el día 47 al día 70 post-inducción CIA. En ambos días de muestreo el grupo que presenta los mayores indicadores corresponde al grupo CIA, mientras que los menores índices los presenta el grupo CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs. Además en ambas fechas el grupo que precede en grado de fibrosis al grupo CIA es el grupo CIA+DEXA+4hLPS/DCs (Cada color representa un grupo de estudio, la barra de la izquierda en cada grupo corresponde al día 47 y la barra de la derecha al día 70 post-inducción CIA).

Existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos CIA y CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs al día 70 post-inducción; CIA y CIA+DEXA+4hLPS/DCs al día 70; CIA y CIA+DEXA al día 47 post-inducción; CIA día 47 y CIA+DEXA+4hLPS/DCs día 70 post-inducción; CIA y CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs día 47 post-inducción (*p 0.05).

DISCUSIÓN.

En el análisis histopatológico del tejido articular, acompañado por otros parámetros como el indicador macroscópico de inflamación articular (Swollen Joints Severity) y el número de articulaciones afectadas (Joint Score) nos permite observar que el curso de CIA (modelo que nos permite estudiar AR) posee una fase inflamatoria de duración limitada alrededor de los días 10 a 14 después del inicio de la enfermedad con una declinación progresiva de este proceso a medida que pasan los días. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, la fase temprana de CIA se caracteriza por una inflamación intensa y degradación de los componentes óseos y cartilagosos de la articulación. En contraste, la atapa tardía está asociada con una progresiva reducción en el nivel de inflamación, apareciendo un gran nivel de fibrosis que fue observada con la tinción de Van Gieson. Estos hallazgos coinciden con lo descrito por Marinova-Mutafchieva *et al.*, 2006 quienes observaron que la AR es una enfermedad crónica con un nivel de inflamación sostenido que puede persistir por años, que posteriormente lleva a la remodelación con un significativo grado de fibrosis de los tejidos involucrados.

Las DCs son las células presentadoras de antígeno por excelencia. La utilización de DCs pulsadas con colágeno tipo II y generadas con estímulos cortos de LPS (4hLPS/CII/DCs) en este estudio, muestran indicadores de enfermedad significativamente menores que el grupo control (CIA+AGUA), tanto en los índices clínicos de severidad y los índices histopatológicos de la enfermedad, como daño de cartílago articular y grado de fibrosis presentado por las articulaciones afectadas. Lo

que coincide con lo expuesto por Salazar *et al.*, (2008) quienes proponen que una única inoculación intraperitoneal de 4hLPS/CII/DCs en animales con CIA totalmente activa, inhibe la progresión de la enfermedad de manera antígeno específica. Además esto es confirmado por Gárate *et al.*, (2013) quienes proponen que la inoculación de DCs moduladas por corto tiempo (4 horas) con LPS es capaz de conferir una mejoría sostenida en ratones con artritis establecida por la re-educación de la población de linfocitos TCD4+, cuyo efecto es dependiente de las vías de señalización del receptor de p38 y TGF- β , lo que sugiere la participación de IL-10 Y TGF- β en la recuperación de la tolerancia. Estos resultados se corroboran con la menor expresión de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF, cuyo efecto provoca un medio propicio para la secreción de metaloproteinasas de matriz (MMPs) que provocan la erosión y el daño articular. Esto es consistente con lo señalado por Aryeh *et al.*, (2006) quienes informan que en el *pannus* se presentan altos niveles de expresión de MMPs, siendo una de las más importantes en AR la MMP-1 (colagenasa), la que tiene la capacidad de degradar el colágeno tipo II presente en el cartílago articular, lo que contribuye a su destrucción, con la consiguiente erosión del tejido óseo subyacente.

La utilización de DCs para propósitos terapéuticos en AR ha sido mejorada al realizar un fenotipo tolerogénico a partir de varias estrategias, incluyendo modelación con agentes como IL-10, TNF, neuropéptidos, LPS, Dexametasona y vitamina D3+LPS.

En este estudio se demuestra que el resultado del tratamiento de ratones CIA que reciben 4hLPS/CII/DCs, puede ser mejorado con la aplicación previa de dexametasona. Se obtuvo la dosis correcta a utilizar del fármaco la que fue de 2mg/kg

con la cual se realizó el pre-tratamiento, obteniendo que el indicador de número de articulaciones afectadas es significativamente menor desde el día 44 al 70 en el grupo CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs con respecto al grupo control ($p < 0,001$). Para el indicador macroscópico de inflamación articular los grupos CIA+DEXA+4hLPS/CII/DCs y CIA+4hLPS/CII/DCs exhibieron puntajes significativamente menores que el grupo control. Un resultado interesante es que el grupo de estudio CIA+Dexametasona+4hLPS/DCs mostró una enfermedad más severa que los otros grupos de estudio, a excepción del grupo control, permitiendo observar la dependencia del antígeno para el efecto tolerogénico. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Chen *et al.*, (2004) y Prado *et al.*, (2011) quienes describieron que la dexametasona producía respuesta positiva al tratar ratones con CIA regulando positivamente la expresión de Foxp3 reduciendo la respuesta perjudicial de Th17 y permite la expansión de la IL-10 producida por grupos de linfocitos T CD4+, los que pueden ser responsables de interferir con la progresión de la enfermedad.

Serra *et al.*, (2012) señala que la dexametasona es un corticosteroide, grupo de fármacos que se destacan por ser anti-inflamatorios muy potentes que son ampliamente utilizados en el tratamiento de AR, se caracterizan por tener un papel beneficioso tanto a corto o largo plazo en el manejo de la enfermedad. Los efectos anti-inflamatorios de los corticoides han sido asociados con una fuerte inhibición de IL-2 secretada por células T, así como la traducción de señales a través del receptor de IL-2. Es así que los ratones que reciben dexametasona muestran una expansión de los linfocitos T reguladores, y los linfocitos T CD4+ tratados *in vitro* con dexametasona aumentan la expresión de linfocitos T reguladores asociados al factor de transcripción

FoxP3 y la citoquina anti-inflamatoria IL-10, aunque se ha propuesto que esta inducción no se correlaciona con un aumento en la función supresora.

En este estudio la histopatología convencional y la histoquímica permitieron observar los cambios en fases iniciales y tardías de la enfermedad, a través de la determinación de indicadores como destrucción del cartílago articular y grado de fibrosis en los tejidos involucrados.

Un hallazgo interesante es el hecho de que el aumento de ambos parámetros están relacionados con el aumento de severidad clínica estudiada a través de: indicador macroscópico de inflamación articular, número de articulaciones afectadas e índice artrítico, por lo tanto, son aspectos importantes de estudiar para diseñar futuros esquemas terapéuticos que ayuden a controlar estos procesos.

CONCLUSIONES.

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

1. En este modelo experimental se logró reproducir con éxito el cuadro clínico de artritis inducida con colágeno bovino tipo II (CIA).

2. Al utilizar como tratamiento de CIA, la inoculación de células dendríticas generadas con estímulos cortos de LPS y pulsadas con colágeno bovino tipo II (4hLPS/CII/DCs) ocurren cambios macroscópicos que fueron considerados en los índices clínicos de enfermedad, que corresponden a: Índice Artrítico (IA), Indicador macroscópico de inflamación articular (Swollen Joints Severity) y Número de articulaciones afectadas (Joint Score), los que fueron significativamente menores con respecto al grupo control (CIA+AGUA).

3. Se demostró que el resultado de ratones CIA que reciben el tratamiento de 4hLPS/CII/DCs puede ser mejorado con la administración previa de dexametasona.

4. El acondicionamiento con dexametasona es capaz de interferir con la aparición y progresión de la enfermedad durante un corto periodo. Sin embargo, esta disminución rápida de la inflamación puede facilitar el despliegue de células dendríticas tolerogénicas pulsadas con antígeno y así mostrar una eficacia superior en el control de la propagación de CIA, que la observada en los ratones CIA

inoculados con DCs tolerogénicas sin acondicionamiento con dexametasona (4hLPS/CII/DCs).

5. La histopatología convencional y la histoquímica permitieron observar los cambios en las articulaciones afectadas, producidos por los distintos tratamientos para CIA en el tiempo (días 47 y 70 post-inducción) los que se relacionan con los índices clínicos de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Acosta-Rodriguez, E. V.; Rivino, L.; Geginat, J.; Jarrossay, D.; Gattano, M.; Lanzavecchia, A. “ Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells”. *Nat. Immunol.* 8: 639-646, 2007.

2. Aida, Y.; Maeno, M.; Suzuki, N.; Namba, A.; Motohashi, M.; Matsumoto, M.; Makimura, M.; Matsumura, H. “The effect of IL-1 on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in human chondrocytes”. *Life Sci.* 79: 764-771, 2006.

3. Aryeh, M.; Abeles, M. D.; Michael, H.; Pillinger, M. D. “The role of sinovial fibroblast in rheumatoid arthritis-cartilage destruction and the regulation of matrix metalloproteinases”. *Bull Hosp. Jt. Dis.* 64 (1-2):20-24, 2006.

4. Barberá, A.; Dominguez, M. “Características e inmunopatogénesis de la artritis reumatoide. Estado actual en el tratamiento”. *Biotecnología aplicada.* 21:189:201, 2004.

5. Butler, D. M.; Malfait, A. M. Mason, L. J.; Warden, P. J.; Kollias, G.; Mainie, R. N.; Feldmann, M.; Brennan, F. M. “DBA/1 mice expressing the human TNF-transgene develop a severe, erosive arthritis: characterization of the cytokine cascade and cellular composition”. *J. Immunol.* 159: 2867-2876, 1997.

6. Cleaver, C. S.; Rowand, A. D.; Cawston, T. E. “Interleukin 13 blocks the release of collagen from bovine nasal cartilage treated with proinflammatory cytokines”. *Ann. Rheum. Dis.* 60: 150-157, 2001.

7. Courtenay, J. S.; Dallman, M. J.; Dayan, A. D.; Martin, A.; Mosedale, B.. “Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice”. *Nature.* 283: 666-668, 1980.

8. Chabaud, M.; Lubberts, E.; Joosten, L.; van den Berg, W.; Miossec, P. “IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis”. *Arthritis Res.* 3: 168-177, 2001.

9. Charbonnier, L. M.; van Duivenvoorde, L. M.; Apparailly, F. « Immature dendritic cells suppress collagen-induced arthritis by in vivo expansion of CD49b+ regulatory T cells”. *J. Immunol.* 177: 3806-3813, 2006.

10. Charni-Ben, T. N. and Garnero, P. “Monitoring cartilage turnover”. *Curr. Rheumatol. Rep.* 9: 16-24, 2007.

11. Chen, X., Murakami, T., Oppenheim, J. J. ; Howard O. M.Z. “Differential response of murine CD4+ CD25+ and CD4+ CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death”. *Eur. J. Immunol.* 34 (3): 859-869, 2004.

12. Dayer, J. M. “The process of identifying and understanding cytokines: from basic studies to treating rheumatic diseases”. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 18: 31-45, 2004.

13. Ferraccioli, G.; Bracci-Laudiero L.; Alivernini, S.; Gremese E.; Toluso B.; De Benedetti, F. “Interleukin-1 and Interleukin-6 in Arthritis Animal Models: Roles in the Early Phase of Transition from Acute to Chronic Inflammation and Relevance for Human Rheumatoid Arthritis”. *Mol. Med.* 16 (11-12): 552-557, 2010.

14. Fraser, A.; Fearon, U.; Billingham, R. C.; Ionescu, M.; Reece, R.; Barwick, T.; Enery, P.; Poole, A. R.; Veale, D. J. “Turnover of type II collagen and aggrecan in cartilage matrix at the onset of inflammatory arthritis in humans: relationship to mediators of systemic and local inflammation”. *Arthritis Rheum.* 48: 3085-3095, 2003.

15. Gárate, D.; Rojas-Collonelli, N.; Peña, C.; Salazar, L.; Abello, P.; Pesce, B.; Aravena, O.; García-González, P.; H. Ribeiro, C.; Molina, M.C.; Catalán, D.; Aguillón, J.C. “Blocking of p38 and transforming growth factor B receptor pathways Impairs the ability of tolerogenic dendritic cells to suppress murine arthritis”. *Arthritis Rheum.* 65(1): 120-129, 2013.

16. Gonzalez-Rey, E.; Chorny, A.; Varela, N.; O' Valle, F.; Delgado, M. “Therapeutic effect of urocortin on collagen-induced arthritis by down-regulation of

inflammatory and Th1 responses and induction of regulatory T cells". *Arthritis Rheum.* 56: 531-543, 2007.

17. Haas, C. S.; Amin, M. A.; Allen, B. B.; Ruth, J. H.; Haines, G. K.; Woods, J. M.; Koch, A. E. "Inhibition of angiogenesis by interleukin-4 gene therapy in rat adjuvant-induced arthritis". *Arthritis Rheum.* 54: 2402-2414, 2006.

18. Joosten, L. A.; Smeets, R. L.; Koenders, M. I.; van den Bersselaar, L. A.; Helsen, M. M.; Oppers-Walgreen, B.; Lubberts, E.; Iwakura, Y.; van de Loo, F. A.; van den Berg, W. B. "Interleukin-18 promotes joint inflammation and induces interleukin-1-driven cartilage destruction". *Am. J. Pathol.* 165: 959-967, 2004.

19. Jou, I. M.; Shiau, A. L. ; Chen, S. Y. ; Wang, C. R. ; Shieh, D. B.; Tsai, C. S.; Wu, L. C. "Thrombospondin 1 as an effective gene therapeutic strategy in collagen induced arthritis". *Arthritis Rheum.* 52 (1): 339-344, 2005.

20. Kobayasi, I., Zif, M. "Electron microscope studies of the cartilage-pannus junction in rheumatoid arthritis". *Arthritis Rheum.* 18:475-483, 1975.

21. Kohno, K. and Kurimoto, M. "Interleukin 18, a cytokine which resembles IL-1 structurally and IL-12 functionally but exerts its effect independently of both". *Clin. Immunol. Immunopathol.* 86: 11-15, 1998.

22. Lebre, M. C. and Tak, P. P. “Dendritic cells subsets: Their roles in rheumatoid arthritis”. *Acta Reumatol. Port.* 33: 35-45, 2008.

23. Lee, D.M.; Weinblatt, M.E. “Rheumatoid arthritis”. *Lancet.* 358:903-911, 2001.

24. Leng, J.; Yao, H.; Shen, J.; Wang, K.; Zhuo, G.; Wang, Z. “Co-expression of IL-18 binding protein and IL-4 regulates Th1/Th2 cytokine response in murine collagen-induced arthritis”. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 40 (2): 116-124, 2008.

25. Leung, B. P.; Conacher, M.; Hunter, D.; McInnes, I. B.; Liew, F. Y.; Brewer, J. M. “A novel dendritic cell-induced model of erosive inflammatory arthritis: distinct roles for dendritic cells in T cell activation and induction of local inflammation”. *J. Immunol.* 169: 7071-7077, 2002.

26. López, M. C. and Leyton, M. “Técnicas de histología y citología”. 2ª ed. Depto. de Biología y Genética, Fac. Medicina. Universidad de Chile. Santiago. Chile. 242p, 1982.

27. Lubberts, E.; Koenders, M. I., van den Berg, W. B. “The role of T cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models”. *Arthritis Res. Ther.* 7: 29-37, 2005.

- 28. Mariinova-Mutachieva, L.; Gabay, C.; Funa, K.; Williams, R. O.** “Remission of collagen-induced arthritis is associated with high levels of transforming growth factor-expression in the joint”. *Clinical and Exp. Immunol.* 146: 287-293, 2006.
- 29. Meyer, L. H.; Franssen, L.; Pap, T.** “The role of mesenchymal cells in the pathophysiology of inflammatory arthritis”. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 20: 969-981, 2006.
- 30. Moghaddami, M.; Cleland, L. G.; Radisic, G.; Mayrhofer, G.** “Recruitment of dendritic cells and macrophages during T cell-mediated synovial inflammation”. *Arthritis Res. Ther.* 9: R120, 2007.
- 31. Nakae, S.; Nambu, A.; Sudo, K.; Iwakura, Y.** “Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17 deficient mice”. *J. Immunol.* 171: 6173-6177, 2003.
- 32. Nistala, K.; Moncrieffe, H.; Newton, K. R.; Varsani, H.; Hunter, P.; Wedderburn, L. R.** “Interleukin-17-producing T cells are enriched in the joints of children with arthritis, but have a reciprocal relationship to regulatory T cell numbers”. *Arthritis Rheum.* 58: 875-887, 2008.
- 33. Oestergaard, S.; Rasmussen, K. E.; Doyle, N.; Varela, A. ; Chouinard, L. ; Smith, S. Y. ; Qvist, P. ; Karsdal, M. A.** “Evaluation of cartilage and bone degradation in a murine collagen antibody-induced arthritis model”. *Scan. J. Immunol.* 67: 304-312, 2008.

34. Otero, M. and Goldring, M. B. “Cells of the synovium in rheumatoid arthritis: chondrocytes”. *Arthritis Res. Ther.* 9: 220, 2007.

35. Palmblad, K.; Erlandsson-Harris, H.; Tracey, K. J.; Anderson, U. “Dynamics of early synovial cytokine expression in rodent collagen-induced arthritis: a therapeutic study using a macrophage-deactivating compound”. *Am. J. Pathol.* 158: 491-500, 2001.

36. Pettit, A. R.; Walsh, N. C.; Manning, C.; Goldring, S. R.; Gravallesse, E. M. “RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis”. *Rheumatology (Oxford)* 45: 1068: 1076, 2006.

37. Prado, C.; Gómez, J.; López, P.; de Paz, B.; Gutiérrez, C.; Suárez, A. “Dexamethasone upregulates FOXP3 expression without increasing regulatory activity”. *Inmunobiol.* 216 (3): 386-392, 2011.

38. Pulai, J. I.; Chen, H.; Im, H. J.; Kumar, S.; Hanning, C.; Hedge, P. S.; Loeser, R. F. “NF- κ B mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments”. *J. Immunol.* 174: 5781-5788, 2005.

39. Salazar, L.; Aravena, O.; Abello, P.; Escobar, A.; Contreras-Levicoy, J.; Rojas-Colonelli, N.; Catalán, D.; Aguirre, A.; Zúñiga, R.; Pesce, B.; González, C.;

Cepeda, R.; Cuchacovich, M.; Molina, M. C.; Salazar-Onfray, F.; Delgado, M.; Toes, R. E.; Aguilón, J. C. “Modulation of established murine collagen-induced arthritis by a single inoculation of short-term lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells”. *Ann. Rheum. Dis.* 67 (9): 1235-1241, 2008.

40. Sánchez-Sánchez, N.; Riol-Blanco, L.; Rodríguez-Fernández, J. L. “The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells”. *J. Immunol.* 176 (9): 5153-5159, 2006.

41. Serra, H., Roganovich, J.M., Rizzo, L. “Glucocorticoides: Paradigma de Medicina Traslacional de lo Molecular al uso clínico”. *Medicina* 72: 158-170, 2012.

42 . Shortman, K. and Caux, C. “Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants”. *Stem Cells.* 15: 409-419, 1997.

43. Shortman, K. and Naik, S. H. “Steady-state and inflammatory dendritic-cell development”. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 19-30, 2007.

44. Shu, L.; Kitani, A.; Fuss, I.; Strober, W. “Cutting edge: regulatory T cells induce CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF- β ”. *J. Immunol.* 178: 6725-6729, 2007.

45. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. “Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach”. Second Edition, México, Mc Graw-Hill, New York, 1980.

46. Tetlow, L. C. and Woolley, D. E. “Mast cells, cytokines, and metalloproteinases at the rheumatoid lesion: dual immunolocalisation studies”. *Ann. Rheum. Dis.* 54: 896-903, 1995.

47. Thoshihico, I.; Mitsumori, S.; Hiroko, K.; Haruco, Y.; Kayoco, N. «Morphology and functional roles of synoviocytes in the joints”. *Arch. Histol. Cytol.* 63 (1): 17-31, 2000.

48. Van den Berg, W. B. and van Riel, P. L. “Uncoupling of inflammation and destruction in rheumatoid arthritis: Myth or reality?”. *Arthritis Rheum.* 52: 995-999, 2005.

49. Van Duivenvoorde, L. M.; van Mierlo, G. J. D.; Boonman, Z. F. H. M.; Toes, R. E. M. “Dendritic cells: Vehicles for tolerance induction and prevention of autoimmune diseases”. *Immunobiol.* 221: 627-632, 2006.

50. Van Duivenvoorde, L. M.; Han, W. G. H.; Bakker, A. M.; Louis-Pence, P.; Charbonnier, L-M.; Apparailly, F.; van der Voort, E. I. H.; Jorgensen, C.; Huizinga, T. W. J.; Toes, R. E. M. “Immunomodulatory dendritic cells inhibit Th1 responses and arthritis via different mechanisms”. *Immunol.* 179: 1506-1515, 2007.

51. Van Holten, J.; Reedquist, K.; Sattonet-Roche, P.; Smeets, T. J.; Plater-Zyberk, C.; Vervoordeldonk, M. J.; Tak, P. P. “Treatment with recombinant interferon-beta reduces inflammation and slows cartilage destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis”. *Arthritis Res. Ther.* 6: R239-R249, 2004.

52. Van Lent, P. L.; Grevers, L.; Lubberts, E.; de Vries, T. J. ; Nabbe, K. C. ; Verbeek, S. ; Oppers, B. ; Sloetjes, A. ; Blom, A. B. ; van den Berg, W. B. “Fc receptors directly mediate cartilage, but not bone, destruction in murine antigen-induced arthritis : uncoupling of cartilage damage from bone erosion and joint inflammation”. *Arthritis Rheum.* 54: 3868-3877, 2006.

53. Verstappen, J. M; Poole, A. R.; Ionescu, M.; King, L. E.; Abrahamowicz, M.; Hofman, D. M.; Bijlsma, J. W.; Lafeber, F. P. “Radiographic joint damage in rheumatoid arthritis is associated with differences in cartilage turnover and can be predicted by serum biomarkers: an evaluation from 1 to 4 years after diagnosis”. *Arthritis Res. Ther.* 8: R31, 2006.

54. Williams, R.O. “Rodent models of arthritis: relevance for human disease”. *Clin. Exp. Immunol.* 114: 330-332, 1998.

55. Yuasa, T.; Kubo, S.; Yoshino, T.; Ujike, A.; Matsumura, K.; Ono, M.; Ravetch, J. V.; Takai, T. “Deletion of Fc gamma receptor IIB renders H-2(b) mice susceptible to collagen-induced arthritis”. *J. Exp. Med.* 189 (1): 187-194, 1999.