

Aportación de los modelos animales al estudio y el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias sistémicas

Jesús Merino^a y Ramón Merino^b

^aDepartamento de Biología Molecular. Universidad de Cantabria. Santander. Cantabria. España.

^bInstituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (CSIC-UC-IDICAN). Santander. Cantabria. España.

Los modelos animales de enfermedades autoinmunitarias, tanto espontáneas como inducidas, han sido una herramienta indispensable para investigar los mecanismos implicados en el desencadenamiento de estas enfermedades en los seres humanos y en el diseño de estrategias terapéuticas para su tratamiento. El desarrollo de técnicas que permiten clonar y modificar los genes ha posibilitado la producción de animales transgénicos que sobreexpresan una determinada proteína o tienen anulada su expresión. Estas técnicas han incrementado en gran medida la disponibilidad de modelos experimentales animales. No obstante, lejos de haber agotado sus posibilidades biotecnológicas, los grupos de investigación expertos en transgénesis siguen generando variaciones metodológicas que permiten modificar la expresión de un gen en tejidos específicos e incluso inducir estas modificaciones en momentos precisos. En el presente artículo se discuten las ventajas y los inconvenientes de los modelos animales y se enumeran los modelos más utilizados en la literatura médica para el estudio de cuatro tipos de enfermedades reumáticas de base autoinmunitaria, como la artritis reumatoide, el lupus eritematoso sistémico, la esclerodermia y las espondiloartritis.

Palabras clave: Modelos animales. Autoinmunidad. Transgénesis.

Contribution of Animal Models to the Study and Treatment of Systemic Autoimmune Disease

Animal models of autoimmune diseases, either spontaneous or induced, have been very useful tools to investigate the mechanisms involved in the pathogenesis of human autoimmune diseases as well as in the design of new therapeutic strategies for their treatment. The development of biotechnology and molecular biology resulted in the production of transgenic animals overexpressing or lacking a given protein. As a result of this technology, a great number of animal models of human diseases have been developed in recent years. A further evolution in transgenic methodology allows the selective control of gene expression in a particular organ or tissue at desired time points during embryonic or postnatal development. In the present article the authors discuss the advantages and inconveniences of animal models and describe the most frequently employed models in the study of 4 rheumatologic syndromes with an autoimmune origin: rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, scleroderma, and spondyloarthritis.

Key words: Animal models. Autoimmunity. Transgenesis.

Introducción

En investigación biomédica, un modelo experimental es un sistema reproducible, más o menos complejo, que se utiliza para estudiar los mecanismos celulares y moleculares que operan en el funcionamiento normal de un órgano o en la producción de una enfermedad. También se recurre al uso de modelos para diseñar y ensayar estrategias terapéuticas, como paso previo a los ensayos clínicos. En un orden creciente de complejidad, los modelos pueden ser moleculares, celulares, tisulares y animales, situándose en la cúspide las enfermedades en los seres humanos. Este último grupo realza la importancia de los criterios diagnósticos que deben cumplir los pacientes para su inclusión en cualquier tipo de estudio

Fuentes de financiación:

JM: Ministerio de Educación y Ciencia, España, proyecto ref. SAF2006-12520-Co2-02; Fundación Marqués de Valdecilla, proyecto ref. API/07/08. RM: Ministerio de Educación y Ciencia, España, proyecto ref. SAF2005-00811; Fundación Ramón Areces, Madrid.

Correspondencia: Dr. J. Merino.

Departamento de Biología Molecular. Facultad de Medicina.
Avda. Cardenal Herrera Oria, s/n. 39011 Santander. Cantabria. España.
Correo electrónico: merinoj@unican.es

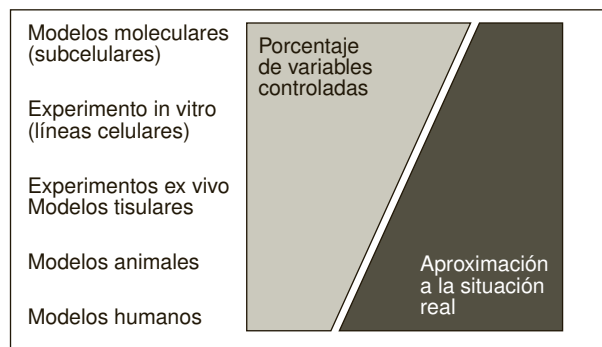


Figura 1. Representación esquemática de los distintos modelos experimentales.

clínico. Cuanto más estrictos sean estos criterios, mayor será la homogeneidad de la muestra clínica y aumentará la validez de las conclusiones del estudio.

Para extrapolar un resultado experimental a una situación clínica real, es importante adaptar el problema biológico que se intenta resolver al tipo de modelo que emplear. Como norma general, cuanto más simple sea un modelo más fácil será su interpretación, pero se alejará más de la situación clínica real (fig. 1). Siguiendo esta lógica, el estudio de un fármaco o un mecanismo fisiopatológico suele dar sus primeros pasos en modelos moleculares sencillos que se complementan con modelos celulares y/o tisulares. Las conclusiones extraídas en ellos darán pie a una fase experimental en modelos animales y finalmente a ensayos clínicos. No siempre se ha hecho así, sobre todo antes del desarrollo de la biotecnología moderna.

Modelos animales

Tanto la caracterización de un mecanismo fisiopatológico como la puesta a punto de una modalidad terapéutica pasan generalmente por la necesidad de realizar ensayos in vivo en diferentes fases del desarrollo experimental, empleando para ello uno o varios modelos animales. Por razones puramente éticas, los ensayos en animales permiten realizar experimentos imposibles de llevar a cabo en los seres humanos. Además, los modelos animales aportan una serie de ventajas metodológicas, con respecto a los estudios clínicos, que incrementan la reproducibilidad de los resultados y facilitan su interpretación:

- Simplicidad en la planificación temporal de los experimentos: todas las manipulaciones (inmunizaciones, administración de fármacos, técnicas quirúrgicas, etc.) se pueden realizar conjuntamente en los distintos grupos de animales a los tiempos que se juzgue oportunos.

Por la misma razón, la monitorización de los animales, incluida la realización de estudios anatomopatológicos, se puede programar para momentos concretos.

- Número prácticamente ilimitado de sujetos de estudio: siempre y cuando las disponibilidades presupuestarias lo permitan, es posible realizar los experimentos con el número de individuos que se considere oportuno. Además, si se usan determinados animales (por ejemplo el ratón o la rata) se puede trabajar con una muestra de individuos genéticamente idénticos.

- Control genético en la muestra. También podemos jugar con variables genéticas, confeccionando grupos experimentales que se diferencien sólo en un rasgo genético determinado o en un número concreto de ellos. Esta posibilidad se ha incrementado de forma espectacular con la aparición de las técnicas de transgénesis, que permiten disponer de animales que sobreexpresan o tienen anulada la expresión de un determinado gen.

Si tenemos en cuenta que en cualquier estudio clínico los pacientes son genéticamente diversos, la severidad de una enfermedad concreta es muy variable de unos enfermos a otros, los pacientes se suelen incluir en el estudio en tiempos diferentes y la obtención de muestras de sangre o de tejidos está limitada por numerosas consideraciones éticas, los modelos animales permiten diseñar escenarios experimentales notablemente más favorables. No obstante, la experimentación animal también cuenta con sus particulares limitaciones. El inconveniente fundamental es que las conclusiones que se extraen de los estudios con modelos animales no siempre son extrapolables (al menos al pie de la letra) a los seres humanos. Estas diferencias son especialmente evidentes cuando el protocolo experimental involucra a microorganismos patógenos, causantes de enfermedades infecciosas e implicados directamente en la gran mayoría de las enfermedades autoinmunitarias. Así, una alta proporción de especies patógenas para el hombre, sobre todo los virus, no lo son para los animales usados en el laboratorio y viceversa. Fuera del contexto microbiológico, la mayoría de los sistemas del organismo (nervioso, inmunitario, endocrino, etc.) guardan mucha semejanza entre los mamíferos, aunque el paralelismo no siempre es completo. Ello se debe a diferencias reales (evolutivas) entre las especies o, en muchas ocasiones, al desconocimiento de la molécula que realiza en una especie la función equivalente en la otra. Estas circunstancias obligan a tener mucha cautela a la hora de trasladar a la clínica los hallazgos observados en los modelos animales.

El segundo problema de la experimentación animal es su elevado coste. Por un lado, unas instalaciones de animalario que cumplan la normativa vigente precisan un espacio físico amplio y una fuerte inversión para acondicionarlo. Por otro lado, las colonias de animales de-

ben mantenerse en óptimas condiciones higiénicas, evitando el hacinamiento de los animales y, como consecuencia, infecciones o parasitosis. Todo ello obliga a la contratación de personal cualificado, a la adquisición de materiales de calidad y a su renovación periódica.

Un inconveniente adicional de los modelos animales es la necesidad de un amplio abanico de técnicas analíticas para obtener el máximo aprovechamiento en los ensayos, lo cual obliga a un esfuerzo adicional, sobre todo en centros de investigación de pequeño tamaño. La necesidad de disponer de un abordaje multidisciplinario es particularmente evidente en modelos animales de enfermedad y en ensayos de fármacos. La situación ideal en estos casos sería poder monitorizar a los animales de la forma más parecida al seguimiento de un paciente en un hospital. En este sentido, además de las técnicas habituales de un laboratorio de inmunología (serología de autoanticuerpos, cultivos celulares, citometría de flujo y técnicas de estudio de proteínas, ARN y ADN), es muy útil disponer de infraestructura para la realización de estudios anatomopatológicos y técnicas de imagen (radiología, ecografía, microscopía confocal, etc.).

Los modelos animales de enfermedad autoinmunitaria constituyen una parcela de la inmunología en continua expansión, fundamentalmente desde la introducción de las técnicas de transgénesis. La inmensa mayoría de estos modelos se reproducen en ratones, aunque hay algunos modelos en ratas o incluso en pollos. Varias razones justifican el uso mayoritario del ratón: *a)* es el animal en el que mejor se conocen las células y moléculas de la respuesta inmunitaria, superando en diversos aspectos al conocimiento del sistema inmunitario humano, lo que facilita el acceso a reactivos; *b)* existen más de 250 estirpes de ratones consanguíneos muy bien caracterizados genéticamente en moléculas esenciales en la respuesta inmunitaria; *c)* la gran mayoría de los animales transgénicos son ratones, dado que las técnicas de transgénesis están optimizadas para este animal, y *d)* el menor tamaño del ratón, respecto a otros mamíferos, permite economizar espacio y abaratar costes.

Los modelos animales de enfermedad autoinmunitaria se agrupan básicamente en dos categorías:

Modelos inducidos. Son aquellos en que el animal padece una determinada enfermedad tras la administración de un “agente externo” (antígenos, células, etc.).

Modelos espontáneos. El animal sufre una enfermedad en ausencia de manipulaciones. Estos animales se han producido generalmente por mutaciones accidentales, en muchos casos tras infección por retrovirus. También se incluyen en este grupo los modelos de animales transgénicos que sufren una enfermedad sin necesidad de manipulaciones adicionales, dado que la alteración genética con la que nacen la heredan de sus progenitores.

Ratones transgénicos

Las técnicas de clonación de genes y de mutagénesis in vitro han hecho posible la producción de animales con mutaciones específicas. En la transgénesis hay, básicamente, dos modalidades técnicas:

– La transgénesis por sobreexpresión tiene su punto de partida principalmente en la microinyección de un gen clonado (transgén) en el pronúcleo masculino de óvulos fecundados. Un número variable de copias del transgén se insertará en el genoma de estos óvulos, los cuales darán lugar a crías transgénicas tras su implantación en el oviducto de hembras de ratón “seudopreñadas”. El transgén provoca, en estos animales y en su descendencia, la expresión aumentada de la proteína que codifica. La magnitud de la expresión dependerá del número de copias insertadas y de su localización en el genoma del ratón. De esta forma se puede estudiar los efectos del exceso de función de una determinada proteína, sobre todo si se dispone de distintas líneas de animales transgénicos con diferente grado de expresión de la proteína. Una variante de esta técnica consiste en la inyección de un transgén que codifica una forma truncada de una proteína (generalmente se anula el dominio efector conservando intacto el dominio de unión a los ligandos). La expresión abundante de estas formas aberrantes (dominantes negativos) suele neutralizar los efectos biológicos de las proteínas nativas. Este método permite valorar las consecuencias de la función defectuosa de las proteínas, sobre todo las implicadas en señalización.

– La segunda modalidad de transgénesis tiene como objetivo la inhibición completa de la producción de una proteína mediante el reemplazo de un gen codificante por un mutante defectuoso incapaz de traducirse (*knock-out* [KO]). Esta técnica, cuyos creadores han sido galardonados en 2007 con el Premio Nobel, se sustenta en dos recientes avances: una estrategia de selección de mutagénesis dirigida y el establecimiento en cultivo de líneas de células madre embrionarias (células ES) que tienen capacidad para generar cualquier linaje celular. El punto de partida es la introducción del gen mutado en células ES de ratón, en las cuales el gen nativo es sustituido por el defectuoso mediante recombinación homóloga. Las células en las que ha habido recombinación se seleccionan gracias a que en el nuevo ADN se han insertado genes de resistencia (selección positiva) y susceptibilidad (selección negativa) a antibióticos (p. ej., neomicina). Posteriormente, las células ES seleccionadas se inyectan en blastocistos y éstos se implantan en una hembra de ratón “seudopreñada”. Los animales quiméricos resultantes portarán el gen mutado en diferentes tejidos de forma aleatoria, en función del destino de las células ES mutadas en el embrión. Sin embargo, sólo podrán transmitir el defecto los animales que presenten la mutación en las células de la línea ger-

minal. Finalmente, los descendientes quiméricos heterocigóticos se aparean para producir ratones KO homocigóticos, incapaces de producir la proteína codificada por el gen anulado. Esta técnica puede hacerse de forma aun más sofisticada, reemplazando un gen endógeno por otra secuencia de ADN, respetando el promotor del antiguo gen. Esta situación posibilita la expresión del nuevo gen (técnica *knock-in*) en situaciones en que se debería expresar el gen nativo. Por ejemplo, el reemplazo de la molécula CD4 por el gen de la betagalactosidasa (que permite colorear en azul las células que lo expresan) sienta las bases para ver lo que sucede con células programadas para expresar el CD4 cuando realmente no pueden expresar esta molécula.

Otra variante muy empleada en la actualidad es la anulación selectiva en un tejido concreto de la expresión de un determinado gen, estrategia de gran interés en los casos en que la supresión generalizada de ese gen sea letal. Esta tecnología innovadora se basa en la utilización de la recombinasa *Cre* que reconoce secuencias de ADN flanqueadas por la secuencia *loxP* (sistema *Cre/loxP*). La técnica consiste en obtener, por un lado, un ratón transgénico de *Cre* precedido de un promotor específico de tejido, lo cual limita la expresión de la recombinasa en ese tejido. Por otro lado se debe obtener otro ratón en el que la secuencia del gen que se quiere anular esté flanqueada por secuencias *loxP*, las cuales no impiden la expresión del gen. Mediante cruce de ambas líneas de ratones se puede obtener animales que sólo tengan anulado el gen en los tejidos que expresen *Cre*, el cual eliminará el ADN flanqueado por las dos secuencias *loxP*.

La posibilidad de activar la recombinasa con determinadas sustancias, como hormonas, nos indica que el nivel de complejidad de esta tecnología está en continua evolución y que las posibilidades de la biotecnología de manipular genes in vivo aún no han tocado techo.

Modelos animales de enfermedades reumáticas autoinmunitarias

Las enfermedades reumáticas de etiopatogenia autoinmunitaria no han escapado a la tentación de los investigadores de desarrollar modelos animales que imiten, de forma más o menos afortunada, sus síntomas más característicos. La tabla 1 sintetiza los modelos animales más utilizados de artritis reumatoide (AR), lupus eritematoso sistémico (LES), esclerodermia (ED) y espondiloartritis (EA).

El modelo de AR más utilizado en la literatura es la artritis inducida por colágeno (AIC). A las 3-4 semanas de la inmunización con colágeno de tipo II comienzan a inflamarse las pequeñas articulaciones de las patas, y luego se afectan el carpo y el tarso. La artritis es erosiva,

TABLA 1. Modelos animales de enfermedades autoinmunitarias

Artritis reumatoide	
Espontáneos	Ratones MRL y SKG
Inducidos	Inmunización con colágeno de los tipos II y XI Administración de adyuvante de Freund Administración de pared de estreptococo Inyección de anticuerpos (anti-Col-II, anti-GPI)
Transgénicos	TNF α ^{TG} , IL-1 ^{TG} , IL-1Ra ^{KO} , K/BxN
Lupus eritematoso	
Espontáneos	(NZB x NZW) _{F1} , MRL/lpr, BXSB.Yaa
Inducidos	Reacciones de hospedador contra injerto (F ₁ →parent)
Transgénicos	Regulación de apoptosis: FLIP ^{TG} , Bcl-2 ^{TG} , Bim ^{KO} Señalización en células T: CTLA4 ^{KO} Señalización en células B: CD19 ^{TG} , SHP-1 ^{KO} , FcγRII ^{KO} , CD22 ^{KO} Depuración de complejos inmunitarios: C1q ^{KO} , C4 ^{KO}
Esclerodermia	
Espontáneos	Ratones TSK (fibrilina-1) Pollos UCD-200
Inducidos	Fibrosis cutánea o pulmonar inducida por bleomicina Fibrosis cutánea o pulmonar inducida por doxorubicina (adriamicina) Reacciones de injerto contra huésped (parent→F ₁). Síndrome tóxico
Espondiloartritis	
Espontáneos	Ratones DBA/1 machos de edad avanzada
Inducidos	Agrecanos: afección axial y periférica Versicano: afección del esqueleto axial Proteína de unión matriz-colágeno: artritis periférica
Transgénicos	HLA-B27 ^{TG}

se acompaña del desarrollo de pannus y llega a producir anquilosis a partir de la décima semana¹. Mediante radiología convencional podemos seguir la evolución de esta artritis. Dependiendo de la fuente de colágeno, el haplotipo del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) del ratón es esencial para que se produzca AIC, y la región de clase II del MHC es lo que determina esta asociación. La mayoría de los estudios se han llevado a cabo en la cepa DBA/1 (H-2q). Una innova-

ción reciente en la patogenia de este modelo es la implicación de un fenotipo de células CD4⁺ recientemente descrito², las células TH17, que se inducen en presencia del factor de crecimiento tumoral beta (TGFβ) e interleucina (IL) 6 y necesitan IL-23 para mantenerse. El interés de estas células es que producen IL-17, la cual en diversos tipos celulares, como los fibroblastos, induce la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNFα), citocina clave en la patogenia de la AR, la AIC y otras enfermedades autoinmunitarias.

Otra forma de inducir artritis semejante a la AR, y que progresivamente está ganando adeptos, es la administración de anticuerpos artritogénicos. Así, la inyección de anticuerpos anticógeno II, usando mezclas de varios monoclonales para distintos epítomos del colágeno II o anticuerpos policlonales de una mezcla de sueros de ratones con AIC, provoca una artritis aguda similar a las primeras fases de la AIC³. Recientemente se ha descrito un modelo de ratones con un TCR transgénico que reconoce la glucosa 6-fosfato isomerasa (ratones K/BxN), un autoantígeno ubicuo pero que se acumula en la superficie del cartílago articular⁴. Estos animales desarrollan una artritis crónica destructiva mediada por anticuerpos contra la GPI⁵, los cuales reproducen una artritis similar a la AR cuando se inyectan en ratones normales.

Los modelos murinos de LES se caracterizan por la presencia de diversos autoanticuerpos en el suero y el desarrollo de glomerulonefritis que acelera la mortalidad de los ratones. Los tres modelos clásicos de LES son el híbrido de primera generación (NZBxNZW)_{F1}, el ratón MRL/lpr y el ratón BXSB⁶. Cada uno de estos modelos se caracteriza por la presencia de un factor acelerador. En los ratones (NZBxNZW)_{F1} son fundamentalmente los estrógenos, que agravan la enfermedad en las hembras. En los ratones BXSB el factor acelerador es una duplicación genética del receptor TLR7 de la inmunidad innata que está presente en el cromosoma Y, lo que hace que los machos padezcan un LES mucho más severo⁷. Finalmente, en los ratones MRL/lpr la ausencia del receptor inductor de apoptosis Fas provoca linfoproliferación (*lpr*) y un lupus letal tanto en machos como en hembras⁸. Junto con estos factores aceleradores, se ha cartografiado diversos loci relacionados con distintos fenómenos autoinmunitarios que componen lo que se ha denominado “el fondo genético proautoinmunitario”. De estos modelos y de este concepto parte una idea esencial para comprender el fenómeno de la autoinmunidad: su carácter poligénico y el poder determinante del tipo de alteraciones genéticas que se acumulan en un mismo individuo⁹. Así, un fenotipo autoinmunitario se manifiesta de forma completa cuando el número y la calidad de las alteraciones genéticas acumuladas en un individuo sobrepasan un determinado “umbral”. De esta forma, conocemos animales que no desarrollan manifestaciones autoinmunitarias o éstas

son ligeras y/o tardías, a pesar de ser portadores de anomalías genéticas mediadoras de fenómenos autoinmunitarios. Sin embargo, cuando éstos se cruzan con otros ratones, en cuyo genoma existen otros genes proautoinmunitarios, los híbridos F₁ resultantes pueden padecer una enfermedad agresiva, rápidamente letal.

De los modelos murinos de LES hemos aprendido también la importancia del control de la muerte celular y, en general, de la regulación de la respuesta inmunitaria en la prevención de la autoinmunidad. En este sentido, la inhibición de la apoptosis en los linfocitos B facilita la supervivencia de células autorreactivas y provoca glomerulonefritis letal¹⁰. En el caso de los linfocitos T hay controversia. Así, mientras en ratones deficientes en Fas la acumulación de linfocitos T en los órganos linfoides secundarios se acompaña de un LES severo⁸, en ratones que expresan un Bcl-2 transgénico en las células T hay un incremento de la función de las células T reguladoras que atenúa las manifestaciones autoinmunitarias en varios modelos murinos¹¹.

También los modelos de ED han contribuido a descifrar los procesos patogénicos implicados en el desarrollo de la fibrosis que sigue a la remodelación del tejido conectivo en el contexto de diversas reacciones inflamatorias. Los modelos espontáneos o inducidos de ED (tabla 1) han mostrado los efectos nocivos de la desregulación de colágenos, fibrilinas y otras proteínas de la matriz extracelular (MEC), muchas de ellas directamente influidas por la concentración de la citocina TGFβ. El más empleado de estos modelos es la administración de bleomicina. Una sola inyección endotraqueal de bleomicina o un análogo, la doxorubicina, provoca un incremento de la matriz extracelular en el pulmón, que ultraestructuralmente adopta la morfología de un cúmulo de membranas basales (colágeno IV). Por vía subcutánea, la bleomicina causa un espesamiento de los haces de colágeno y depósitos de material homogéneo, muy similares a los observados en la ED, que se traducen en fibrosis, alopecia, hiperpigmentación, edema, fenómeno de Raynaud y gangrena¹². La sobreproducción de TNFα tiene un papel crucial en la inducción de fibrosis en este modelo, como prueba la eficacia del bloqueo con anticuerpos anti-TNFα en la prevención del cuadro clínico.

Finalmente, la inmunización con proteoglicanos (PG) procedentes del cartílago o de los discos intervertebrales induce una poliartrosis progresiva, con espondilitis y entesitis, semejante a la espondilitis anquilosante¹³. Los PG más inmunógenos son los agreganos, PG de alta densidad mayoritarios en el cartílago¹⁴. Otro PG utilizado para inducir artritis es el versicano, que forma parte del anillo del disco intervertebral, los ligamentos espinales y las entesis. Su inyección provoca espondilitis, sacroileítis y entesitis, pero prácticamente no induce artritis periférica¹⁵. Por el contrario, la inmunización con la proteína de unión de la matriz del cartílago, que esta-

biliza la unión del agregano con el ácido hialurónico en la matriz del cartílago hialino, induce una poliartritis erosiva en ausencia de artropatía axial¹⁶.

Bibliografía

1. Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol.* 2003;25:3-18.
2. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005;6:1123-32.
3. Stuart JM, Cremer MA, Townes AS, Kang AH. Type II collagen-induced arthritis in rats: passive transfer with serum and evidence that IgG anticollagen antibodies can cause arthritis. *J Exp Med.* 1982;155:1-16.
4. Sakaguchi S, Sakaguchi N. Animal models of arthritis caused by systemic alteration of the immune system. *Curr Opin Immunol.* 2005;17:589-94.
5. Maccioni M, Zeder-Lutz G, Huang H, Ebel C, Gerber P, Hergueux J, et al. Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice. *J Exp Med.* 2002;195:1071-7.
6. Santiago-Raber ML, Laporte C, Reininger L, Izui S. Genetic basis of murine lupus. *Autoimmun Rev.* 2004;3:33-9.
7. Kelley J, Johnson MR, Alarcón GS, Kimberly RP, Edberg JC. Variation in the relative copy number of the TLR7 gene in patients with systemic lupus erythematosus and healthy control subjects. *Arthritis Rheum.* 2007; 56:3375-8.
8. Merino R, Fossati L, Iwamoto M, Takahashi S, Lemoine R, Ibnou-Zekri N, et al. Effect of long-term anti-CD4 or anti-CD8 treatment on the development of lpr CD4-CD8- double negative T cells and of the autoimmune syndrome in MRL-lpr/lpr mice. *J Autoimmun.* 1995;8:33-45.
9. Jørgensen TN, Gubbels MR, Kotzin BL. New insights into disease pathogenesis from mouse lupus genetics. *Curr Opin Immunol.* 2004;16: 787-93.
10. Marquina R, Díez MA, López-Hoyos M, Buelta L, Kuroki A, Kikuchi S, et al. Inhibition of B cell apoptosis promotes the development of an spontaneous IgA nephropathy associated with SLE in (NZW x C57BL/6)F1-bcl-2 transgenic mice. *J Immunol.* 2004;172:7177-85.
11. González J, Tamayo E, Santiuste I, Marquina R, Buelta L, González-Gay MA, et al. CD4+CD25+ T cell-dependent inhibition of autoimmunity in transgenic mice overexpressing human Bcl-2 in T lymphocytes. *J Immunol.* 2007;178:2778-86.
12. Yamamoto T. Animal model of sclerotic skin induced by bleomycin: a clue to the pathogenesis of and therapy for scleroderma. *Clin Immunol.* 2002;102:209-16.
13. Bardos T, Szabo Z, Czipri M, Vermes C, Tunyogi-Csapo M, Mikecz K. Longitudinal study of an autoimmune murine model for ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:981-7.
14. Glant TT, Buzás EI, Finnegan A, Negroiu G, Cs-Szabó G, Mikecz K. Critical roles of glycosaminoglycan side chains of cartilage proteoglycan (aggrecan) in antigen recognition and presentation. *J Immunol.* 1998;160: 3812-9.
15. Shi S, Ciurli C, Cartman A, Pidoux I, Poole AR, Zhang Y. Experimental immunity to the G1 domain of the proteoglycan versican induces spondylitis and sacroiliitis of a kind seen in human spondylarthropathies. *Arthritis Rheum.* 2003;48:2903-15.
16. Zhang Y, Guerassimov A, Leroux JY, Cartman A, Webber C, Lalic R, et al. Induction of arthritis in BALB/c mice by cartilage link protein: involvement of distinct regions recognized by T and B lymphocytes. *Am J Pathol.* 1998;153:1283-91.