



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“PARTICIPACIÓN DE LAS ADIPOCITOCINAS DURANTE
LAS RESPUESTA INFLAMATORIA EN LA ARTRITIS
REUMAOTIDE”**

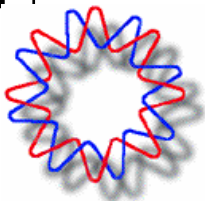
T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

L. en C. Carolina Bustos Rivera Bahena.

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE LUIS MONTIEL HERNÁNDEZ.



CUERNAVACA, MORELOS; JUNIO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

INDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
INDICE DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	10
SUMMARY.....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
1. GENERALIDADES.....	12
1.1 ARTRITIS REUMATOIDE (AR).....	12
1.2 ASPECTOS INMUNOLÓGICOS.....	14
1.3. DIAGNOSTICO.....	19
1.4 PARTICIPACIÓN DE LAS CITOCINAS EN AR.....	22
1.4.1 IL-6.....	23
1.4.2 TNF- α	24
2. ADIPOCITOCINAS.....	28
2.1 LEPTINA.....	30
2.2 ADIPONECTINA.....	34
2.3 RESISTINA.....	37
2.4 ADIPOCITOCINAS Y ARTRITIS REUMATOIDE.....	38
II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	40
III. HIPOTESIS.....	41
IV. OBJETIVO.....	42
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	42
V. METODOLOGÍA.....	43
5.1 COLECTA DE MUESTRAS.....	43
5.2 OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLOS DE CUANTIFICACIÓN.....	45
(ELISA).....	45
5.2.1 ELISA PARA LEPTINA.....	48
5.2.2 ELISA PARA ADIPONECTINA.....	48
5.2.3 ELISA PARA RESISTINA.....	49
5.2.4 ELISA PARA TNF- α	50
5.2.5 ELISA PARA IL-17.....	50
5.2.6 ELISA PARA IL-6.....	51
5.3 EVALUACIÓN CLÍNICA Y DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS.....	52
5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	52
5.5 REACTIVOS.....	53
VI. RESULTADOS.....	54
6.1 POBLACIONES DE ESTUDIO.....	54
6.2.1 DILUCIÓN DE PLASMAS A EVALUAR.....	55
6.2.2 OPTIMIZACIÓN DE DILUCIÓN DE ANTICUERPOS.....	58
6.2.3 NIVELES DE LEPTINA EN PACIENTES CON AR.....	60
A) CURVA PATRÓN.....	60
B) DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES EN DONADORES Y PACIENTES.....	61
C) CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE LEPTINA Y ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD.....	62

D) CORRELACIÓN DE LEPTINA Y EL TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	64
E) CORRELACIÓN DE LEPTINA Y EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC) .	65
F) RELACIÓN DE LEPTINA Y AUTOANTICUERPOS	66
G) RELACIÓN CON CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS	68
6.2.4 NIVELES DE ADIPONECTINA EN PACIENTES CON AR	69
A) CURVA PATRÓN	70
B) DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES EN DONADORES Y PACIENTES	71
C) CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE ADIPONECTINA Y ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD.	71
D) CORRELACIÓN DE ADIPONECTINA Y EL TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD	73
E) CORRELACIÓN DE ADIPONECTINA Y EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC).....	74
F) RELACIÓN DE ADIPONECTINA Y AUTOANTICUERPOS.....	75
G) RELACIÓN CON CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS	77
6.2.5 NIVELES DE RESISTINA EN PACIENTES CON AR.....	79
A) CURVA PATRÓN	79
B) DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES EN DONADORES Y PACIENTES	80
C) CORRELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE RESISTINA Y ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD	81
D) CORRELACIÓN DE RESISTINA Y EL TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	82
E) CORRELACIÓN DE RESISTINA Y EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC).....	83
F) RELACIÓN DE RESISTINA Y AUTOANTICUERPOS	84
G) RELACIÓN CON CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS	85
VII. DISCUSION Y CONCLUSIONES	87
7.1 POBLACIONES EN ESTUDIO	87
7.2 EVALUACIÓN METODOLÓGICA.....	88
7.3 RELACIÓN ADIPOCITOCINAS Y ACTIVIDAD CLÍNICA.....	89
7.4 RELACIÓN DE ADIPOCITOCINAS Y AUTOANTICUERPOS.....	94
7.5 RELACIÓN ADIPOCITOCINAS Y CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS.	94
7.6 PARTICIPACIÓN DE LAS ADIPOCITOCINAS EN EL DESARROLLO DE LA AR.	96
VIII. PERSPECTIVAS	99
APENDICE A (IL-6).....	100
APENDICE B (TNF- α).....	103
APENDICE C (IL-17).....	107
APENDICE D.....	111
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	113

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Participación de las citocinas en la patogénesis de la Artritis Reumatoide

Tabla 2.- Relación Adipocitocina y Artritis

Tabla 3.- Reactivos y soluciones

Tabla 4.- Datos demográficos

Tabla 5.- Cuadro integral de condiciones para determinación por ELISA de adipocitocinas y citocinas.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.- Esquema general de factores asociados a la enfermedad.
- Figura 2.- Patogénesis de la Artritis Reumatoide.
- Figura 3.- Extravasación de leucocitos hacia el foco de inflamación.
- Figura 4.- Adipocitocinas: mediadores entre el tejido adiposo, inflamación e inmunidad.
- Figura 5.- Representación esquemática de la estructura general de los diferentes subtipos de receptores de leptina (ObR).
- Figura 6.- Ligando y Receptor de Leptina.
- Figura 7.- Receptor, ligando y función de adiponectina en la inflamación
- Figura 8.- Activación a través de resistina a su receptor.
- Figura 9.- Protocolo general de la técnica de ELISA.
- Figura 10.-Diseño general de los ensayos para cuantificación de citocinas por ELISA.
- Figura 11.-Titulación de la dilución de plasma de donadores (D) y pacientes (P).
- Figura 12.-Titulación de los anticuerpos primarios y secundarios.
- Figura 13.-Curva patrón para leptina.
- Figura 14.-Niveles de leptina en plasma encontrado entre pacientes con AR y donadores.
- Figura 15.-Relación entre el nivel de leptina plasmática y el grado de actividad
- Figura 16.-Comparación entre los niveles de leptina en las subpoblaciones de pacientes divididos por su actividad.
- Figura 17.-Relación entre el tiempo de evolución, los niveles de leptina y la estratificación.
- Figura 18.-Relación entre el nivel de leptina plasmática y el IMC en donadores y pacientes con AR.
- Figura 19.-Relación entre el nivel de leptina plasmática y el FR entre pacientes con AR.
- Figura 20.-Relación entre el nivel de leptina plasmática y α PCC en pacientes con AR.
- Figura 21.-Correlación de adipocitocinas y citocinas inflamatorias en pacientes AR.
- Figura 22.-Curva patrón para Adiponectina.
- Figura 23.-Niveles de Adiponectina en plasma de pacientes con AR y donadores.
- Figura 24.-Relación entre el nivel de Adiponectina plasmática y el grado de actividad.
- Figura 25.-Comparación de los niveles de Adiponectina plasmática entre los subgrupos de actividad para los pacientes con AR.
- Figura 26.-Relación entre el tiempo de evolución y los niveles de Adiponectina.
- Figura 27.-Comparación entre el nivel de Adiponectina plasmática de las dos poblaciones en estudio y el IMC.
- Figura 28.-Relación entre el nivel de Adiponectina plasmática y el FR entre pacientes con AR.
- Figura 29.-Relación entre el nivel de Adiponectina plasmática y entre α PCC pacientes con AR.
- Figura 30.-Correlación de adipocitocinas y citocinas inflamatorias en pacientes AR.
- Figura 31.-Curva patrón para Resistina.
- Figura 32.-Comparación de los niveles de Resistina en plasma de pacientes con AR y donadores.
- Figura 33.-Relación entre el nivel de Resistina plasmática y el grado de actividad.
- Figura 34.-Comparación del nivel de Resistina plasmática entre los grupos de pacientes con AR divididos en base al grado de actividad.
- Figura 35.-Relación entre el tiempo de evolución y los niveles de Resistina.
- Figura 36.-Relación entre el nivel de Resistina plasmática y el IMC en donadores y pacientes con AR.
- Figura 37.-Relación entre el nivel de Resistina plasmática y el FR entre pacientes con AR
- Figura 38.-Posible participación de las adipocitocinas en el proceso inflamatorio inducido durante el desarrollo de la Artritis Reumatoide.

- Figura 39.-Curva patrón para IL-6.**
- Figura 40.-Niveles de IL-6 en plasma encontrado entre pacientes con AR y donadores .**
- Figura 41.-Relación entre la actividad, el tiempo de evolución, el IMC y el título de aPCC con los niveles de IL-6.**
- Figura 42.-Curva patrón para TNF α .**
- Figura 43.-Los pacientes presentan niveles sanguíneos mayores de TNF-a con respecto a los donadores.**
- Figura 44.-Relación entre la actividad, el tiempo de evolución, el IMC**
- Figura 45.-Relación estadística entre los títulos de autoanticuerpos FR y aPCC con los niveles de TNF- α**
- Figura 46.-Relación estadística entre los títulos de autoanticuerpos altos para FR y aPCC con los niveles de TNF- α .**
- Figura 47.-Curva patrón para IL-17.**
- Figura 48.-Niveles de IL-17 en plasma encontrado entre pacientes con AR y donadores.**
- Figura 49.-Relación entre el nivel de IL-17 plasmática y el grado de actividad.**
- Figura 50.-Relación entre el tiempo de evolución, los niveles de IL-17 y la estratificación de los diferentes grupos.**
- Figura 51.-Relación entre IMC y Título de anticuerpos.**

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Aa	Aminoácidos
Ab	Anticuerpo
ACR	Colegio Americano de Reumatología
AFA	Anti- Filagrina
ADN	Ácido desoxirrebonucleico
aPCC	Anticuerpos péptido citrulinados Cíclicos
APF	Antifactor perinuclear
AKA	Anticuerpos antiqueratina
AR	Artritis reumatoide
ARN-m	Ácido ribonucleico mensajero
CETS	Centro Estatal de Transfusión Sanguínea
°C	Grados centígrados
DAS 28	Valoración de actividad clínica de la de enfermedad
D.O.	Densidad óptica
EDTA	Sal disodica del ácido etilendinitrilo tetracético
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción dependiente de enzimas
ERK	Señal-regulador extracelular kinasa
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FARMES	Fármacos modificadores de la enfermedad
FR	Factor reumatoide
g/ml	Gramo por cada mililitro
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos
HAQ	Cuestionario de Valoración de la Salud
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HRP	Peroxidasa de rábano
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IFN- γ	Interferón gama
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina

IMC	Índice de masa corporal
LS	Líquido sinovial
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfocitos T
μl	Microlitros
ml	Mililitros
MRL	Reacción variada de linfocitos de memoria
MTX	Metrotexate
NaN ₃	Ázida de Sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sodio
NF-κB	Factores de Transcripción nuclear kappa-Beta
ng/ml	Nanogramos por cada mililitro
NK	Linfocitos asesinos naturales
nm	Nanómetros
NOS	Óxido nítrico sintetasa
Ob-R	Receptor de leptina
OPD	Ortofenil-endiamina
PAD	Peptidilarginina deaminasa
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Proteína C Reactiva
%	Porcentaje
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RFA	Reactantes de fase aguda
SSA	Amiloidosis secundaria
rpm	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema Nervioso Central
STAT	Activadores Transcripción y Transducción de señales
TAB	Tejido adiposo blanco
TCD4 ⁺	Linfocitos CD4 positivos
TNF-α	Factor de necrosis Tumoral-α
Treg	Células T reguladoras

VEGF	Factor de crecimiento de epitelio vascular
VIH	Virus de la inmunodeficiencia Humana
VSG	Velocidad de Sedimentación Globular

RESUMEN

La Artritis Reumatoide es una enfermedad inflamatoria sistémica y crónica, que afecta principalmente las membranas sinoviales de las articulaciones periféricas. En estas circunstancias, la inflamación articular es el síntoma más frecuente en la AR, lo cual ocasiona dolor, erosión ósea, deterioro de la función e incapacidad del paciente.

A nivel mundial se estima una prevalencia entre 0.4 y 1.5 %, la ausencia de estudios en México no permite dar una estimación, sin embargo el INEGI-2005, reporta una prevalencia entre 0,3 al 0,5% de la población total, dentro de este porcentaje las mujeres suelen estar más afectadas, aunque la etiología de la enfermedad es desconocida.

Por su parte las adipocitocinas son moléculas bioactivas que secreta el tejido adiposo y que juegan un papel importante en el metabolismo energético corporal, al tiempo que presentan efectos inmunoreguladores. En nuestro grupo de trabajo, se realizaron estudios donde observamos un aumento significativo en la sangre y liquido sinovial de pacientes con AR, de la adipocitocina Leptina, con respecto a donadores sanos

En el presente proyecto, hemos ampliado al estudio de la Leptina y la interacción de otras dos adipocitocinas, adiponectina y resistina así como intentado dar solución a la respuesta heterogénea de la adipocitocinas en la enfermedad Artritis Reumatoide, limitando nuestro estudio con individuos en condiciones nutricionales (índice de masa corporal, IMC), de género (mujeres) y socioeconómicas semejantes, tanto en el caso de los pacientes como de los donadores y correlacionando los resultados con parámetros inflamatorios como auto-anticuerpos, y citocinas (TNF α , IL-17 e IL-6), así como con la actividad clínica.

Los resultados generales de nuestro estudio muestran que los pacientes con AR tienen niveles significativamente mayores de leptina, con respecto a donadores ($p < 0.05$) y que el incremento de esta se acompañaba de un incremento de adiponectina, pero no de resistina. Haciendo notar de manera importante que el incremento en los niveles de adiponectina y leptina no pueden explicarse por una variación en la proporción de grasa corporal, sino más bien como respuesta a la actividad inflamatoria, así como el incremento de las adipocitocinas se relaciona con pacientes con mayores índices de actividad clínica.

En paralelo se observó que cada adipocitocina parecía asociarse con etapas diferentes de la enfermedad (temprana para la adiponectina y tardía para leptina), al tiempo que observamos una correlación positiva de leptina con IL-17, mientras que los niveles mayores de Adiponectina se asociaban con TNF α , con factor reumatoide y anti péptidos citrulinados cíclicos.

Estos resultados sugieren que estas adipocitocinas podrían participar durante el proceso de la inflamación sistémica y crónica, característica de la AR. Al mismo tiempo, el monitoreo de 2 años de un subgrupo de pacientes de los niveles de Leptina/adiponectina podrían ser utilizados como biomarcadores para el pronóstico de la enfermedad en pacientes mestizos mexicanos

SUMMARY

Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease of unknown etiology that affects the synovial membrane at the peripheral joints. The consequence of the joint inflammation triggers the disease symptoms, such as pain, bone erosion, joint dysfunction and physical disability. All over the world is estimated a prevalence between 0.4 to 1.5%, although in México this information is incomplete, INEGI 2005 has estimated a prevalence between 0.3-0.5% in the population. Finally, women are more affected by RA, suggesting a role of sexual hormones in the disease etiology.

On the other side, the adipocytokines are molecules secreted essentially by the adipose tissue that play a fundamental role in the energy metabolism. Recently it has been postulated effects over the immune system, proposing an immunoregulatory role. In a previous study in our group, we observed higher levels of leptin in the peripheral blood of RA patients with respect to healthy donors. With the aim of increase our knowledge about the potential role of the adipocytokines in the systemic inflammation of RA patients, in the present study we increased the size of the sample, we quantify the adipocytokines leptin, adiponectin and resistin, at the same time that pro-inflammatory cytokines (IL-6 and IL-17) and autoantibodies (rheumatoid factor and aCCP). Additionally, our sample of donors and RA patients was paired with respect to adipose tissue proportion (Body Mass Index) and gender (female).

The global results showed that RA patients had statistically higher levels of leptin and adiponectin, with respect to healthy donors ($p < 0.05$), but levels of resistin were similar between the groups. Interestingly, the increase of these adipocytokines was independent of the BMI, suggesting a different mechanism depending of the inflammatory status or the clinical activity of RA patients. Additionally, we observed that leptin and adiponectin seem to associate with a different phase of the RA development: whereas the adiponectin increased during the early phase, the leptin was higher at the late phase. We also observed a significant correlation between leptin and IL-17 levels, whereas increase of adiponectin was associated with the induction of TNF- α , Rheumatoid Factor and aCCP.

All these results suggest that adipocytokines are associated during the chronic and systemic inflammation of RA patients. Increased serum levels could play a role during the pro-inflammatory cytokine induction or the autoantibodies synthesis, although the immunological consequences must to be confirmed by *in vitro* studies. Interesting, in a two- year follow-up study of RA patients, we observed a significant correlation between leptin and IL-17 levels and clinical activity, suggesting its use as clinical biomarker of RA activity.

I. INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES

1.1 ARTRITIS REUMATOIDE (AR)

Los procesos autoinmunes se caracterizan por el desarrollo de una respuesta inflamatoria crónica como respuesta a la presencia de células o tejidos propios. Las causas de esta perturbación son desconocidas y se sugiere que sea el resultado de múltiples factores, tanto medioambientales como genéticos (Van der Helm-van et al, 2005). Dentro de estas enfermedades, nos interesa destacar la Artritis Reumatoide (AR) tanto por importancia epidemiológica como por su patogénesis. La AR es, una enfermedad inflamatoria sistémica y crónica, que afecta principalmente las membranas sinoviales de las articulaciones periféricas. En estas circunstancias, la inflamación articular es el síntoma más frecuente en la AR, lo cual ocasiona dolor, deterioro e incapacidad del paciente. La consecuencia más común de este cuadro inflamatorio crónico lo constituye la erosión de cartílago y hueso, la deformación progresiva de las articulaciones y la reducción de la movilidad articular, lo que puede llevar al enfermo a una severa discapacidad. Aunque las manifestaciones se presentan regularmente en la población adulta (de 20 a 60 años), puede comenzar a cualquier edad (Cardiel et al, 2002). Según estimaciones del IMSS, la AR es la principal causa en nuestro país que genera discapacidad en las personas adultas (Cardiel et al, 2002). Aunque a nivel mundial se estima una prevalencia entre 0.4 y 1.5 %, la ausencia de estudios en México no permite dar una estimación, sin embargo el INEGI-2005, reporta una prevalencia entre 0,3 al 0,5% de la población total (Cardiel et al, 2002).

Debido a que las mujeres presentan una prevalencia tres veces mayor que la de los varones, se sugiere que los estrógenos u otras hormonas sexuales pudieran participar en la patogénesis de la enfermedad, aunque los estudios al respecto ofrecen resultados discordantes (Ruiz et al, 2001). En contradicción con lo anterior es que puede desarrollarse esta patología incluso en mujeres después de la menopausia (Zauli et al, 2003).

La influencia genética ha sido ampliamente descrita en esta patología, sin embargo, los estudios genéticos en pacientes han mostrado sólo correlaciones parciales con algunos parámetros moleculares como: los alelos HLA-DRA1/4, PTPN22 (protein tyrosine

phosphatase, nonreceptor type 22), PADI4 (peptidyl arginine deiminase Type IV), CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), FcγRs (Fc receptors para IgG) y varios loci de citocinas y receptores de citocinas como el que codifican para TNF-α, interleucina-1 (IL-1), IL-10 e IL-18 (Cha et al, 2007; Gourraud et al, 2007; Michou et al, 2007). En general se reconoce que el principal factor genético asociado al riesgo de desarrollar AR se localiza en el locus DRB1, perteneciente a la región clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), que codifica la cadena beta de la molécula HLA-DR. Se ha descrito una mayor frecuencia en desarrollar AR en individuos con la secuencia de aminoácidos Gln-Lys-Arg-Ala-Ala en los residuos 70-74 de HLA-DR1. A esta secuencia particular se le conoce como epítipo compartido (Del Rincón et al, 1999; Gourraud et al, 2007). En poblaciones caucásicas ha sido descrita su asociación (Klareskog et al, 2006), sin embargo, en otras poblaciones ha sido menos clara su importancia (Lee et al, 2007).

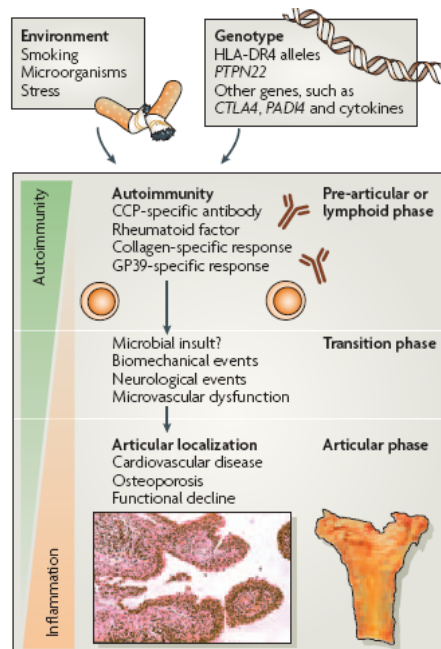


Figura 1.- Esquema general de factores asociados a la enfermedad. Múltiples factores han sido considerados como posibles desencadenadores de la AR, entre ellos factores ambientales, factores genéticos y mecanismos inmunológicos como mimetismo molecular, McInnes et al, 2007

Sin embargo, estos factores se asocian parcialmente a la incidencia de la AR, lo cual sugiere la participación de otros factores en el desarrollo de esta enfermedad, tales como ambientales e inmunológicos. Todo esto ha derivado en que se considere este desorden como multifactorial (Choy et al, 2001; Klareskog et al, 2007). (ver Figura 1)

1.2 ASPECTOS INMUNOLÓGICOS

El recubrimiento sinovial constituye un tejido vascularizado que recubre las articulaciones, manteniendo una presión negativa y asegurando la presencia de fluidos lubricantes en el espacio articular. La capa externa de la cápsula articular está recubierta por una colección densa de fibras de colágeno. Asimismo, en el espacio articular, se localizan algunas células adiposas, y finalmente, recubriendo el espacio articular, se localiza la membrana sinovial (ver Figura 2). Esta membrana está constituida por dos tipos celulares característicos: los sinoviocitos de tipo A y B, siendo las células del primer tipo las que presentan funciones fagocíticas y pueden interactuar con las células presentadoras de antígenos (Bingham et al, 2002). Los sinoviocitos de tipo B presentan morfología fibroblástica y son los principales productores del ácido hialurónico, el componente mayoritario del líquido sinovial, y del intercambio de líquidos entre la sangre y la membrana sinovial (Feldmann et al, 2001).

La inflamación puede definirse como una reacción defensiva local integrada por alteración, exudación y proliferación. La respuesta inflamatoria ocurre sólo en tejidos conectivos vascularizados y surge con el fin defensivo de aislar y destruir al agente dañino, así como reparar el tejido u órgano dañado. La reacción es desencadenada por estímulos nocivos de muy diversa naturaleza: físicos, químicos y microorganismos como bacterias, hongos y parásitos así como alteraciones inmunitarias: como por ejemplo las respuestas de hipersensibilidad o las autoinmunes (Abbas et al, 1999).

Las manifestaciones clínicas de la AR coinciden con la activación e infiltración de los leucocitos hacia el líquido sinovial. Entre estos, los linfocitos reclutados en el líquido sinovial producen citocinas que amplifican la respuesta inflamatoria, al tiempo de estimular el reclutamiento de otras células inmunológicas a la articulación, activando las células residentes, y favoreciendo la producción del líquido sinovial (Feldmann et al, 2001). En los procesos inflamatorios agudos, la migración leucocitaria se inicia con la expresión de moléculas de adhesión (L-selectina, ICAM-1) en la superficie de los linfocitos. Esta adhesión es débil y permite que las células “rueden” sobre la superficie de las células endoteliales de los vasos sanguíneos. La expresión de nuevas proteínas de adhesión permite una unión más firme y estable. A continuación, los leucocitos se deforman y migran entre

las uniones de las células endoteliales (diapédesis), para posteriormente alcanzar los tejidos o, en este caso, la membrana sinovial (ver Figura 2). Después de su llegada al tejido sinovial, estas células pueden interactuar con los sinoviocitos de tipo A (macrófagos), induciendo su activación y proliferación. Como consecuencia de esta interacción, se activan las células T y se estimula la producción de citocinas pro-inflamatorias. Las citocinas, contribuyen a la extravasación de los leucocitos, al alterar la expresión de las moléculas de adhesión. Numerosas citocinas regulan la adhesión celular, incluyendo la interleucina-1 β , y el factor de necrosis tumoral (TNF α), dos citocinas abundantes en los pacientes con AR.

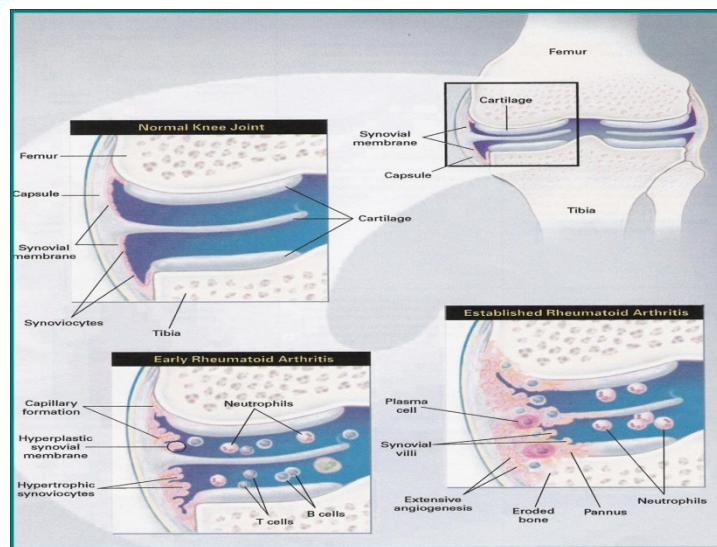


Figura 2.- Patogénesis de la Artritis Reumatoide. Diagrama comparativo entre articulaciones normal, con AR temprana y con AR establecida, en donde la infiltración de leucocitos y factores inflamatorios causan el daño y severidad en la articulación, Choy et al, 2001.

La membrana sinovial en pacientes con AR está caracterizada por hiperplasia, aumento de la vascularidad e infiltrado de células inflamatorias, principalmente células T CD4⁺, las cuales son las principales responsables de la respuesta inmune celular, esta última definida como la respuesta específica en la que los linfocitos T atacan y destruyen células propias, tumorales o infectadas.

Por su parte, el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (HLA-II) será el responsable de la presentación de los péptidos antigénicos por las células presentadoras de antígeno (CPA) a las células CD4⁺ (Choy et al, 2001). Para poder explicar el carácter autoinmune, a través de estudios se ha sugerido que la AR podría originarse por la

generación de antígenos artritogénicos, los cuales podrían encontrarse enriquecidos en las articulaciones. Su presencia podría desencadenar una respuesta inmunológica clásica tipo TH1, la cual derivaría en la inflamación. Se han sugerido múltiples candidatos para ser considerados como auto-antígeno, dentro de los cuales se ha propuesto un origen tanto exógeno (moléculas derivadas de infecciones viral o bacterianas (mimetismo molecular) (Albani et al, 1992; Hoffman et al, 1997), como endógena (moléculas derivadas de la proteólisis parcial y/o modificación química); sin embargo, hasta la fecha no se ha identificado este antígeno.

Los mecanismos que protegen al organismo contra infecciones son los mismos que causan la inflamación crónica y destrucción del cartílago en la AR. Entre ellos podemos resaltar los mecanismos de activación de las células T, tales como la producción de citocinas pro-inflamatorias y la activación de células T citotóxicas, macrófagos, y otras células capaces de producir y activar metaloproteasas que erosionan el cartílago y el hueso, llevando a la deformación (Shingu et al, 1993). Al mismo tiempo, las células T CD4⁺ de memoria se acumulan predominantemente en el tejido sinovial, gracias a la expresión de moléculas de adhesión, permitiendo su unión al endotelio vascular y su movimiento hacia el microambiente sinovial (Kong et al, 1999). A pesar de que la AR se considera una patología asociada a la respuesta inmune celular, la respuesta inmune humoral, que involucra la activación de las células B y la generación de autoanticuerpos, parece jugar un papel relevante, aunque poco entendido (Kroot et al, 2000).

Por su parte, las células T CD4⁺, dependiendo del microambiente de señales químicas (citocinas) van a diferenciarse en fenotipos específicos, siendo los más reconocidos: a) Los linfocitos T colaboradores tipo 1 (Th1) se caracterizan por producir una serie de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-2, interferón gama, TNF α , que median las respuestas celulares, mientras que; b) los Th2 produce citocinas (IL-4, IL-6, IL-10) y que se encargan de la diferenciación y activación de los linfocitos B (inmunidad humoral), c) los Th17, que requieren de TGF- β e Il-6 para que los linfocitos CD4⁺ puedan diferenciarse a este tipo celular y se caracterizan por la producción de IL-17 y, d) los Treg (CD4⁺/CD25⁺/FoxP3⁺). En la fase temprana de la AR, se observa una clásica respuesta de tipo Th1. Sin embargo, en una fase crónica, concurren mecanismos tanto humorales como celulares (Janeway et al, 2005).

Durante la inflamación el endotelio emite señales que estimulan la migración de los leucocitos. En la circulación normal los leucocitos transitan suspendidos en el plasma sanguíneo en un flujo sin contacto directo con la superficie endotelial de los vasos. Sin embargo, cuando los tejidos se dañan, se liberan citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β y TNF α) que ocasionan modificaciones en las propiedades adhesivas de la célula endotelial lo que permite la migración de los leucocitos al sitio de la lesión (Janeway et al, 2005). La dilatación local de las vénulas induce la marginación de los leucocitos que se desplazan arrastrados por la circulación “rodando” sobre el endotelio. Este proceso, suele denominarse “rolling” es favorecido por la presencia de las proteínas de adhesión que conllevan a una cascada de adhesión de varios pasos (ver Figura 3). Si durante el rodar, a lo largo de la pared del vaso, los receptores de los leucocitos captan la señal de una sustancia quimiotáctica, se activan induciendo un aumento de la afinidad de otro tipo de proteínas de adhesión de los leucocitos, llamadas integrinas, como LFA-1 y MAC-1 que se fijan firmemente a los ligandos del endotelio como ICAM-1, produciendo que las células se detengan sobre el endotelio.

Los factores quimiotácticos o quimiocinas son moléculas solubles que se difunden pasivamente desde su sitio de producción. Su interacción con los receptores específicos en la membrana de los leucocitos provocará cambios en la expresión de las moléculas de adhesión, favoreciendo su migración orientada en el sentido de su gradiente de concentración creciente.

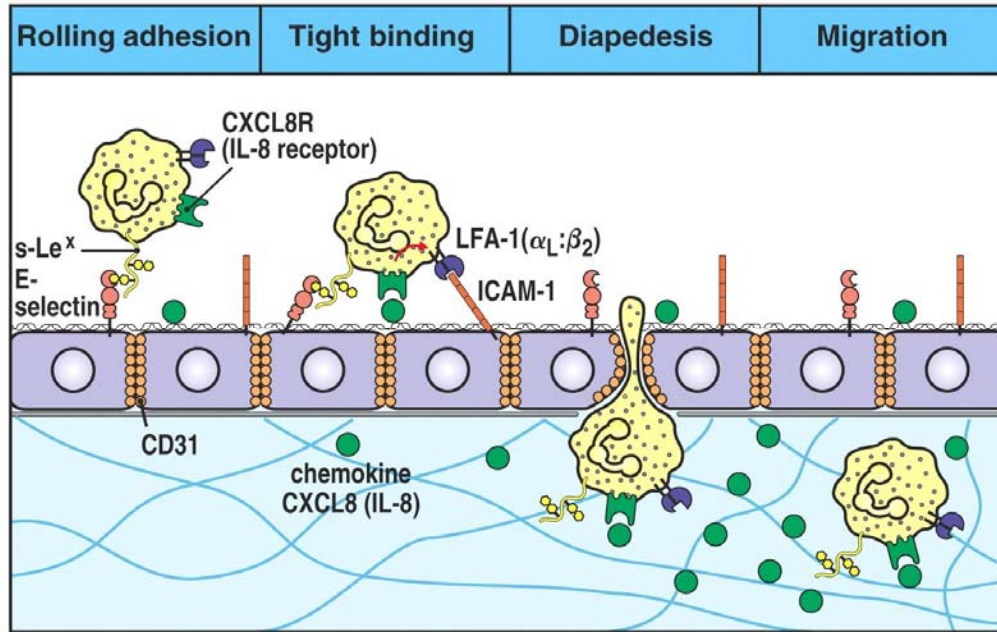


Figura 3.- Extravasación de leucocitos hacia el foco de inflamación. Ante un proceso inflamatorio, leucocitos migran al foco de inflamación, así la extravasación de estos, es un proceso en el que participan en forma concertada y secuencial diversas moléculas de adhesión y citocinas que hacen posible el desarrollo de las siguientes fases: Interacción y adhesión inicial de los leucocitos con el endotelio, rodamiento de leucocitos sobre el endotelio, activación de los leucocitos, adhesión firme al endotelio y extravasación y migración transendotelial a tejidos, Janeway et al, 2005.

Una vez adheridos a la superficie endotelial siguiendo las señales direccionales proporcionadas por los factores quimiotácticos (polarizados) y usando las integrinas para su fijación y tracción, los leucocitos se desplazan a través de los capilares y vénulas, extendiendo pseudópodos a través de las uniones intercelulares del endotelio vascular (diapedesis). Finalmente cruzan la membrana basal ingresando al intersticio y concentrándose en esa zona (infiltración leucocitaria) (ver Figura 3).

Se conoce que la inflamación del sinovio generada por la artritis involucra una gran cantidad de quimiocinas. Por ejemplo, quimiocinas tales como CCL2, CCL5, CCL21 y CXCL13 contribuyen a la infiltración de linfocitos T en el sinovio. Otras quimiocinas participan en el reclutamiento de otros leucocitos, la diapedesis y su retención en el tejido inflamado o también llamado “homing” (Kawahata et al, 2009). En todas estas actividades las quimiocinas funcionan junto con las citocinas en regular tanto la expresión de células inmunes como la de sus receptores. La expresión de quimiocinas y su importancia

funcional en la Artritis Reumatoide ha generado vastos estudios donde son los blancos de fármacos (Haringman et al, 2004), aunque no se ha logrado una terapia exitosa.

Los neutrófilos son las células predominantes en el fluido sinovial de los pacientes con AR. En condiciones de inflamación aguda por infección entre otras estrategias, los neutrófilos son grandes productores de radicales libres del oxígeno(EROS) , lo cual elimina niveles elevados de los microorganismos. En el caso de la AR, se han determinado elevados niveles de EROS, posiblemente producto de estas células (Janeway et al, 2005). Adicionalmente, también ocurre la activación y acumulación de macrófagos, los cuales junto con linfocitos y fibroblastos, pueden estimular la angiogénesis, lo cual podría explicar el aumento de la vascularidad encontrado en el sinovio de pacientes con AR (Choi et al, 2001).

1.3. DIÁGNOSTICO

El diagnóstico de la AR se basa en criterios clínicos propuestos por el American College of Rheumatology (ACR) (Clegg et al, 1987), los cuales consisten fundamentalmente de la valoración de paciente y del médico, así también se toma en consideración el nivel de inflamación y dolor articular, aunado con una evaluación serológica (Velocidad de sedimentación globular (VSG), Proteína C reactiva (PCR), etc.). Aún en estas circunstancias, los síntomas de otros tipos de patología coinciden con la AR, de ahí la necesidad de contar con elementos de detección temprana y específico, para poder diagnosticar la enfermedad de manera temprana.

Entre los biomarcadores más empleados se encuentran los autoanticuerpos. Cuyos niveles aumentan durante la vejez en personas “sanas”, sin embargo los pacientes con algunos tipos de enfermedades autoinmunes presentan niveles altos aún a edad temprana. Existe una gran heterogeneidad de autoanticuerpos aunque su efecto directo sobre el proceso inflamatorio es poco conocido.

Las pruebas clínicas más utilizadas determinan los niveles de los autoanticuerpos específicos contra el dominio Fc de IgG/IgM ó también conocido como factor reumatoide (FR). Varios estudios mostraron que los pacientes con AR positivos para el factor reumatoide suelen tener un curso clínico más desfavorable, con mayor lesión estructural articular y mayor frecuencia de manifestaciones extra-articulares que las seronegativas

(Canete et al, 2000). Un factor reumatoide persistentemente elevado se asocia con erosiones, así como un bajo puntaje en el Cuestionario de Valoración de la Salud (HAQ) y un mayor número de articulaciones dolorosas y tumefactas. Cuando se analizan poliartritis de inicio reciente (<1 año), el factor reumatoide puede ser un parámetro importante. Sin embargo, se ha evidenciado que la presencia del factor reumatoide no es específica para la AR, debido a que sus niveles se pueden detectar en el 5% de las personas sanas. La frecuencia del factor reumatoide en la población general aumenta con la edad siendo entre el 10 al 20% de las personas mayores de 65 años (Correa et al, 2004).

Otros desórdenes inmunológicos pueden coincidir con un alto nivel de FR. Entre ellos se pueden citar el lupus eritematoso sistémico, el síndrome de Sjögren, hepatopatías crónicas, sarcoidosis, fibrosis pulmonar intersticial, mononucleosis infecciosa, hepatitis B, tuberculosis, lepra, sífilis, endocarditis bacteriana subaguda, leishmaniasis visceral, esquistosomiasis y el paludismo. El factor reumatoide puede aparecer de forma transitoria en personas normales tras una vacunación, transfusión, y ser detectada en familiares de pacientes con AR.

Por otro lado, se han observado que otras reactantes de fase aguda como la ceruloplasmina y la proteína C reactiva (PCR) aumentan y correlacionan con la actividad de la AR, así como con la probabilidad de lesión articular progresiva. En años recientes, los clínicos de preferencia se refieren a los niveles de autoanticuerpos específicos para péptidos citrunilados cíclicos (aPCC).

La citrulina es un aminoácido no esencial que no se incorpora a las proteínas durante la traducción, sino ocurre por modificación de los residuos de Arginina. La citrulinación constituye un cambio postraducciona l producido por la peptidilarginina deaminasa (PAD) sobre residuos de arginina. Los anticuerpos anti-proteínas citrulinadas fueron inicialmente descritos como antifactor perinuclear (APF) y, posteriormente como anticuerpos anti-queratina (AKA) y anti-filagrina (AFA), hasta la identificación del antígeno común, la citrulina (Sebbag et al, 2005). Las proteínas que se han identificado como blancos citrulinados para los anticuerpos son diversas, entre las cuales la principal es la filagrina, la vimentina y fibrina.

La citrulinación no es un evento específico de la membrana sinovial, sino que se puede observar en diversos tejidos siempre asociada a la inflamación crónica, como en

músculos de pacientes con polimiositis, tejido colónico en pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales, amígdalas en pacientes con tonsilitis crónica y en bronquios de fumadores (Makrygiannakis et al, 2006). En cambio, la generación de autoanticuerpos contra péptidos citrulinados sólo ha sido observada en la AR. Los autoanticuerpos podrían ser secretados localmente por células plasmáticas contra proteínas citrulinadas de la sinovial inflamada, sin embargo, su presencia ha sido evidenciada tanto en sangre periférica como en el líquido sinovial. (Vossenaar et al, 2004)

Varios estudios han sugerido que la citrulinación tendría un papel patogénico, vinculándola con el epítoto compartido del HLA. En la presentación antigénica a las células T, la presencia de alelos HLA-DRB1 *0401 parece conferir susceptibilidad para el desarrollo de la AR en poblaciones caucásicas (Gourraud et al, 2007). No se ha identificado el o los antígenos desencadenante(s), se ha propuesto un modelo por el cual la secuencia de aminoácidos en el HLA podría favorecer la respuesta autoinmune. En este sentido, la secuencia 74-77, correspondiente al epítoto compartido, constituiría un “pocket, P4” del HLA capaz de interactuar con los péptidos citrulinados debido a la ausencia de carga, mientras que no sería accesible a la Arginina, a causa de su carga positiva (Hill et al, 2003).

Schellekens y colaboradores (1998) al estudiar un grupo de enfermos con AR de inicio reciente, observaron que los niveles de aPCC fueron más específicos que el FR para esta enfermedad (96 frente al 91%), aunque ligeramente menos sensibles (48 frente al 54%) y que la combinación de las pruebas proporcionaba un alto valor predictivo para positivos (91%) y para negativos (78%). En otro estudio (Lee et al, 2003) con 249 sueros consecutivos se observó una diferencia mayor: 66% de sensibilidad y 90,4% de especificidad para el aPCC, mientras que el FR hubo 71,3% y 80,3% respectivamente. En resumen los diversos estudios realizados han confirmado que los aPCC son muy específicos para la AR. En base a su alta especificidad y su presencia temprana durante la patogénesis se sugiere que los autoanticuerpos podrían desempeñar un papel importante en la patogénesis de la AR (Matsui et al, 2006). Adicionalmente, otros estudios propusieron que los autoanticuerpos aPCC permitían monitorear la erosión ósea y la deformación. En este sentido, en un estudio clínico longitudinal, Nell y colaboradores (2005) observaron que los factores que mejor predicen el desarrollo de la AR son la asociación entre FR y aPCC, seguido por el aumento de los niveles de aPCC.

De acuerdo con el trabajo de Kroot y colaboradores (Kroot et al, 2000), se predice que los pacientes seropositivos para aPCC tienen un mayor daño radiológico después de seis años de seguimiento, comparado con pacientes aPCC negativos.

La determinación de aPCC combinada con FR-IgM tiene valor adicional sobre la determinación aislada de FR en pacientes con poliartritis temprana. En un estudio se demostró que al combinar la determinación de anti-AFA o aPCC con FR la especificidad de AR alcanzó el cien por cien. Otro estudio demostró una especificidad del 80 a 90%. Así, se podría afirmar que la determinación de anti-PCC en la artritis reciente podría contribuir a facilitar el diagnóstico de las AR en fase precoz, tanto por sí solos como en combinación con el FR (Hoffman et al, 2005; Kamoun et al, 2005; Gomez 2005).

En años recientes, se han descubierto blancos de autoanticuerpos con mayor especificidad que aPCC para la AR, presentando una especificidad de 98% para Vimentina citrulinada, que corresponde a los autoanticuerpos anti-Sa, (Menard et al, 2000). Sin embargo, aún no se comprende cabalmente la repercusión de estos autoanticuerpos sobre la respuesta inflamatoria crónica.

1.4 PARTICIPACIÓN DE LAS CITOCINAS EN AR

Las citocinas son una familia de proteínas de bajo peso molecular que regulan, la inmunidad innata y la inmunidad específica. Dado que algunas citocinas pueden ser producidas por varios tipos celulares, muchas de estas citocinas a menudo pueden actuar sobre muchos tipos celulares (Abbas et al, 1999). Su participación individual se hace particularmente difícil. En general, se considera que el perfil general de citocinas da una mejor idea sobre los efectos posibles en las células blanco.

En este contexto, varios estudios clínicos y modelos animales han confirmado la participación importante de las citocinas en la respuesta autoinmune. Por ejemplo, los tratamientos más exitosos para el control de la respuesta inflamatoria en artritis se han basado en la neutralización de citocinas pro-inflamatorias tales como TNF- α e IL-6 (Kremer et al, 2005). Como se describió previamente en la patogenia de la AR, el papel de las citocinas es fundamental y una gran cantidad de estas moléculas se han caracterizado en su participación durante esta enfermedad.

1.4.1 IL-6

En 1988 Kishimoto y colaboradores clonaron el cDNA de la interleucina humana, BCDF/BSF-2, la cual fue posteriormente nombrada como interleucina-6 (IL-6) (Hirano 1986). Casi al mismo tiempo fue determinado su receptor: con un dominio extramembranal (IL-6r) e intermembranal (gp130), estos fueron caracterizados respectivamente en 1986 y 1988 (Tanabe et al, 1988).

La IL-6 es una glicoproteína helicoidal de 20 a 30 Kd cuyo gen se localiza en el cromosoma 7 (Mock et al, 1989). Bajo condiciones normales, la principal fuente de IL-6 son células inmunes, células endoteliales y adipocitos.

La AR fue una de las primeras enfermedades inflamatorias en la que se describió un importante aumento en los niveles de IL-6, detectable tanto en el plasma como en el tejido sinovial. (Nawata et al, 1989; Hovdenes et al, 1990).

Se considera que los principales efectos del aumento sistémico de la IL-6 en el curso de la AR son el aumento de los reactantes de fase aguda (RFA) como la proteína C reactiva por lo tanto, la amiloidosis secundaria (SSA), la anemia de enfermedad crónica, la osteoporosis sistémica y el incremento del riesgo vascular. Recientemente se confirmó su importante participación en la diferenciación de las células T hacia el fenotipo Th17, las cuales han mostrado un papel activo en desordenes inflamatorios, así como en la destrucción articular de pacientes con AR (Kotake et al, 1999; Pickens et al, 2010). También, IL-6 estimula la resorción ósea y puede jugar un papel importante en la osteoporosis peri-articular característica de la AR temprana (McInnes et al, 2007).

En el tejido sinovial, tanto las células mononucleares del infiltrado como los fibroblastos sinoviales o sinoviocitos de tipo B parecen contribuir en la secreción de IL-6. Aunque varias de las células implicadas en la sinovitis (condrocitos, sinoviocitos, fibroblastos, endoteliales) parecen no expresar el receptor IL6R en su membrana, se ha sugerido su activación dependiente de IL-6 mediante un mecanismo de transeñalización.

Los efectos locales o sistémicos de la IL-6 en las células del sistema inmunitario, las células B autoinmunitarias o diferentes poblaciones de células T se desconocen en el contexto de la AR. Sin embargo sus funciones en estas células y su participación en los modelos animales para la artritis son mejor conocidos.

Los modelos animales permiten sugerir que la IL-6 no sólo es importante en los mecanismos de inmunorregulación, sino que es un importante efector de la inflamación crónica y destrucción tisular. Varios estudios proponen que el aumento de IL-6 se asocia con la generación del foco inflamatorio. Este microambiente se completa con la inducción de quimiocinas tales como MCP-1 y la expresión de moléculas de adhesión las cuales permiten modificar el ingreso de neutrófilos por el de células mononucleares (Lisignoli et al, 2002).

Además de sus amplios efectos en el reclutamiento celular, IL-6 modifica la respuesta de las diferentes células que infiltran en la membrana sinovial, como se describe a continuación. La IL-6 modula la respuesta de los linfocitos T y B infiltrantes del tejido sinovial y participa en el reclutamiento de monocitos, contribuyendo a su diferenciación y activación. (McInnes et al, 2006)

Los efectos de la IL-6 en los fibroblastos sinoviales incluyen efectos en su crecimiento y sobrevivencia; así como modulación de la síntesis de otros factores fibroblásticos como las quimiocinas, VEGF o RANK. De esta manera, puede contribuir a la inflamación crónica (reclutamiento celular y angiogénesis) y a la erosión ósea (Van Snick et al, 1990). Aunque los efectos directos de la IL-6 en el cartílago son poco conocidos, parece inhibir la síntesis de proteínas de la matriz del cartílago e inducir la síntesis del inhibidor tisular de metaloproteinasas (TIMP) (Van Snick et al, 1990). Finalmente, Uno de los efectos más estudiados de la biología ósea es el efecto osteoclastogénico de IL-6, el cual se sugiere ocurre por mediación de la inducción de RANKL en células de la estroma y los osteoblastos. Por lo tanto, de forma similar a otras citocinas, la IL-6 tiene potentes efectos sobre el remodelado óseo, con capacidad para producir osteoclastogénesis y erosiones locales. (Riminucci et al, 2003).

1.4.2 TNF- α .

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es miembro de un grupo de citocinas que estimulan la fase aguda de la reacción inflamatoria. Es una hormona glicopéptica formada por 185 aminoácidos, derivada de un pro péptido formado por 212 aminoácidos. Genéticamente el TNF- α está relacionado con el cromosoma 6p21. La liberación de TNF- α

produce activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, lo que conduce al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento provocando la activación de los linfocitos T y B. También puede ocasionar un aumento en la activación, la adhesión plaquetaria y la oclusión vascular, efecto de donde proviene su nombre. (Abbas et al, 1999)

Las funciones del TNF- α se deben a que se une a 2 receptores distintos que se localizan en diferentes células como neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos. Además, estos receptores se han encontrado en estado soluble en el suero y líquido sinovial aunque su función no es bien conocida (Deleuran et al, 1992).

En el contexto de la AR, se ha observado que la sobreexpresión de TNF- α e IL-1 parecerían ser importantes tanto en el proceso inflamatorio como en el daño articular (Feldmann et al, 2001). En este sentido, se ha visto que en el líquido y tejido sinovial de pacientes con AR existen concentraciones elevadas de TNF α y que en ratones transgénicos que sobreexpresan esta citocina, desarrollan un fenotipo con síntomas semejantes al AR (Malfait et al, 2001). Sumado a lo anterior, los resultados del tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-TNF α en pacientes con AR, han demostrado un beneficio clínico significativo, permitiendo incluso detener la progresión de la enfermedad en los pacientes respondedores (Feldmann et al, 2001).

Existen diversas condiciones clínicas, demográficas y genéticas que se han asociado con una evolución más severa de la AR. Dentro de estas últimas se ha investigado la asociación de los polimorfismos de TNF- α (Feldman et al, 2001) con la severidad de la AR. Estudios realizados, han demostrado una asociación independiente del polimorfismo microsatélite de TNF α 2 con una enfermedad más erosiva. Por otro lado, el genotipo -238GG se asocia también a una forma severa de la enfermedad, mientras que los genotipos -238GA y +498GG se asociarían con una menor progresión de la AR (Vinasco et al, 1999;, Fabris et al, 2002)

Con el objetivo de dar una visión general sobre la participación de las citocinas sobre el desarrollo de la AR, la Tabla I se resume la relación de las principales moléculas involucradas con esta enfermedad.

Tabla-1 Participación de las citocinas en la patogénesis de la Artritis Reumatoide

<i>CITOCINA</i>	<i>EXPRESIÓN EN LA ARTICULACIÓN</i>	<i>FUNCIÓN POTENCIAL EN LA PATOGENESIS</i>
IL-1 α y/o IL-1 β	Monocitos, células B, fibroblastos sinoviales, condrocitos	\uparrow Citocinas de fibroblastos sinoviales, quimiocinas, MMP, iNOS y liberación de PG; \uparrow citocinas monocíticas, activación de osteoclastos; \downarrow síntesis GAG, \uparrow iNOS, MMP y agrecanasa; expresión de la molécula de adhesión endotelial
IL-18	Monocitos, PMNs, Células dendríticas (CDs), plaquetas, células endoteliales	Diferenciación de células T (células Th1 con IL-12; células Th2 con IL-4); activación de células NK, liberación de citocinas, \downarrow síntesis de GAG de condrocitos, expresión de iNOS, liberación de citocinas por monocitos y la expresión de la molécula de adhesión, activación de PMN liberación de citocinas y migración.
TNF- α	Monocitos, células T y B, células NK, PMNs, células cebadas, fibroblastos sinoviales y osteoblastos	\uparrow Activación de monocitos, liberación de citocinas y PG; \uparrow priming PMN, apoptosis y estallido oxidativo; apoptosis de células T, regulación clonal y disfunción del TCR; \uparrow expresión de la molécula de adhesión endotelial, liberación de citocinas; \downarrow proliferación de fibroblastos sinoviales y síntesis de colágeno, \uparrow MMP y liberación de citocinas; \uparrow liberación de ácidos grasos desde adipocitos, efectos endocrinos.
LT α y/o LT β	Células T, monocitos fibroblastos sinoviales.	Desarrollo de órgano linfoide periférico; tiene bioactividades similares a TNF.
RANKL	Células del estroma, osteoblastos, células T.	Estimula la reabsorción en el hueso por la vía de la maduración y activación de osteoclastos; modulación de las interacciones entre células T y CD
BAFF	Monocitos, células T, CDs	Proliferación de células B, secreción de anticuerpos, cambio de isotipo y sobrevivencia; co-estimulación de células.
APRIL	Monocitos, células T	Proliferación de células B
IL-17 ^a	Células Th17, fibroblastos sinoviales	\uparrow citocinas de fibroblastos sinoviales y liberación de MMP; osteoclastogénesis; hematopoyesis; \downarrow síntesis de GAG por condrocitos ; \uparrow producción de citocinas por leucocitos
IL-12	Macrófagos, CDs	Maduración y proliferación de células Th1; citotoxicidad de células T y NK; activación de células B.
IL-23	Macrófagos, CDs	Proliferación de células Th17
IL-7	Fibroblastos sinoviales monocitos?	Expansión y sobrevivencia de células T; activación de macrófagos; regulación hematopoyética; regulación tímica; maduración de células NK.
IL-15	Monocitos, células B, células cebadas, fibroblastos sinoviales, PMNs y CDs	Quimiocinesis de células, activación y mantenimiento de memoria ;diferenciación de células B y cambio de isotipo; activación de células NK y citotoxicidad, activación de fibroblastos sinoviales;

		activación/supresión macrófago (dosis dependiente); activación de PMN expresión de la molécula de adhesión y estallido oxidativo.
IL-10	Monocitos, células T y B, CDs, células epiteliales	↑Liberación de citocinas del macrófago, iNOS y expresión del receptor soluble, ↓ROI; liberación de citocinas de las células T; ↓ expresión MHC, inducción de anergia, maduración y función efectora (?) de células TReg; ↓activación y liberación de citocinas en CD; ↓ liberación de colágeno y MMP en fibroblastos sinoviales; ↑cambio de isotipo en células B
IL-6	Monocitos, fibroblastos sinoviales, células B y T	Proliferación y producción de anticuerpos de células B; hematopoyesis y trombopoyesis; proliferación diferenciación y citotoxicidad de células T; ↑respuesta hepática de fase aguda; ↑efectos neuroendocrinos
Oncostatina M	Monocitos y células T activadas	Diferenciación del megacariocito; ↑liberación de TIMP y citocinas en fibroblastos sinoviales, ↑reactivos en fase aguda, ↑ inhibidores de proteasas; ↓ liberación de TNF en monocitos, ↓ función efectora de IL-1; ↑ efectos neuroendocrinos y liberación de corticosteroides; modulación de osteoclastos (?)
TGFβ	Fibroblastos sinoviales, monocitos, células T, plaquetas	Reparación de heridas, mantenimiento de la matriz y fibrosis; proliferación de células TH17 y TReg; ↓ proliferación y función efectora de células NK; activación inicial y posterior supresión de la respuesta inflamatoria; ↑quimioatrayente de leucocitos en fase temprana, expresión de gelatinasa e integrina; activación temprana y supresión posterior de macrófagos; ↓expresión iNOS
Familia BMP (BMP2–BMP15)	Células epiteliales, fibroblastos sinoviales, tejidos mesenquimales embrionarios	Regula la quimiotaxis, mitosis y los procesos de diferenciación durante la condrogénesis y osteogénesis; morfogénesis del tejido
PDGF	Plaquetas, macrófagos, células endoteliales, Fibroblastos sinoviales	Factor de crecimiento paracrino y/o autocrino para varias líneas; reparación
Familia FGF	Fibroblastos sinoviales, Monocitos	Crecimiento y diferenciación del mesenquima, epitelio y células neuroectodérmicas
VEGF	Monocitos, células endoteliales, fibroblastos Sinoviales	Angiogenesis
IL-32	Células epiteliales, monocitos, fibroblastos sinoviales	Liberación de citocinas, PG y MMP de macrófagos
MIF	Macrófagos, células T activadas, fibroblastos	↑Fagocitosis del macrófago, liberación de citocinas y NO; activación de células T, DTH; proliferación de

	sinoviales	fibroblastos, Expresión de COX, expression de PLA2 y actividad oxidoreductasa ('citozima')
IFNs Tipo I	Amplia expression	Efectos inmunomoduladores; ↑expresion MHC; activación de macrófagos; activación, diferenciación, sobrevivencia, alteraciones del citoesqueleto de linfocitos (antiproliferative)

↑sobreexpresión, ↓expresión baja, PG prostaglandinas, MMP metaloproteinasas, PMN polimorfonucleares, T reg células T reguladoras, TH1 respuesta tipo uno, NK células natural killer, GAG glucosaminoglicanos, MHC complejo mayor de histocompatibilidad, TGFβ factor de crecimiento tumoral beta, NO oxido nítrico, MIF factor inhibitorio de migración, COX ciclooxygenas, PLA2 fosfolipasa, BMP proteína morfogenética de hueso, IFN interferón.

2. ADIPOCITOCINAS

En años recientes se ha reconocido que el tejido adiposo secreta varias moléculas bioactivas llamadas adipocinas o “adipocitocinas” que provienen principalmente del tejido adiposo blanco (TAB) y que parecen jugar un papel importante en la homeostasis de varios procesos fisiológicos. Entre estos procesos se puede incluir: la ingesta de alimentos, la regulación del equilibrio energético, la acción de la insulina, el metabolismo de la glucosa la secreción por ejemplo de, proteína estimuladora de acilación (ASP), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), interleucina 6 (IL-6), resistina, leptina y adiponectina; también participan en la remodelación de la vascularización, la regulación de la presión arterial y la coagulación con moléculas como el angiotensinógeno y el inhibidor del activador de plasmininógeno (PAI-1)] (Bays et al, 2004).

En el humano, el tejido adiposo se divide en el tejido adiposo marrón (TAM) que es el encargado de la termogénesis y el tejido adiposo blanco (TAB), encargado del almacenamiento de la grasa y la secreción de citocinas (Dusere et al, 2000). Como tejido secretor, el TAB presenta varias características particulares:

- a) El TAB no está confinado en una sola región, se encuentra distribuido a través de todo el organismo en depósitos individuales que no están conectados físicamente, por lo que se sugiere algún tipo de comunicación. Sin embargo, no se conocen los mecanismos de interconexión.
- b) El TAB está constituido por diferentes tipos celulares, entre los cuales se incluyen: fibroblastos, preadipocitos, adipocitos maduros, y macrófagos, los cuales contribuyen, en mayor o menor grado, en la función secretora del TAB.

- c) El tejido adiposo es sumamente heterogéneo en términos de sus capacidades metabólicas, de acuerdo con su localización visceral o subcutánea.
- d) Algunas adipocinas también son secretadas por tejidos diferentes al adiposo y no se puede determinar con exactitud cuál es la contribución de un tejido en particular en sus niveles circulantes. Además, es poco lo que se conoce con respecto a los mecanismos moleculares involucrados en la regulación, biosíntesis, secreción y efectos biológicos de las adipocinas (Fried et al, 1998; Duserre et al, 2000; Mora et al, 2002).

Varios estudios sugieren que la expresión y síntesis de las adipocinas está regulada en base a las alteraciones del TAB, sean o no en condiciones patológicas. Por ejemplo, se ha observado que la obesidad ocasiona una respuesta inflamatoria crónica caracterizada por la producción anormal de citocinas y la activación de vías de señalización relacionadas con las respuestas inflamatorias (Wellen et al, 2003). Un aspecto interesante es que la interrelación entre inflamación crónica y desordenes tales como la obesidad, la diabetes tipo 2 (DT2), la enfermedad cardiovascular y al síndrome metabólico, lo cual permite sugerir que coinciden en los mecanismos moleculares. Un elemento más a considerar es que actualmente somos testigos de un incremento en la prevalencia del aumento de peso y de la obesidad en la población mundial, parámetro que se viene a sumar a otros factores ambientales-nutricionales en el estudio de diferentes patologías. Por lo tanto, el cambio en el perfil de adipocinas expresadas durante la obesidad conlleva elementos nuevos a considerar para entender el desarrollo de enfermedades complejas como la DT2, el síndrome metabólico y la AR (Sánchez-Muñoz et al, 2005).

De manera reciente se han reunido evidencias experimentales que apoyan fuertemente la participación de las adipocinas en la regulación de la respuesta inmune y, particularmente, en la respuesta inflamatoria. Entonces, la expansión del tejido adiposo durante el aumento de peso generalmente va a derivar en un aumento en los niveles de adipocinas tales como leptina, ghrelina (otra adipocina que secreta el TAB) y resistina, las cuales parecen ejercer efecto sobre células del sistema inmune, modificando su activación y regulación. Adicionalmente, de manera característica durante la obesidad, se ha observado el reclutamiento de macrófagos, vía el ligando de quimiocina (CCL2), entre otras señales (Kanda et al, 2006). Estos macrófagos activados pueden fagocitar los

adipocitos en proceso de apoptosis, dando origen a las células espumosas, las cuales va amplificar la inflamación local y sistémica (Tilg et al, 2006) (ver Figura 4).

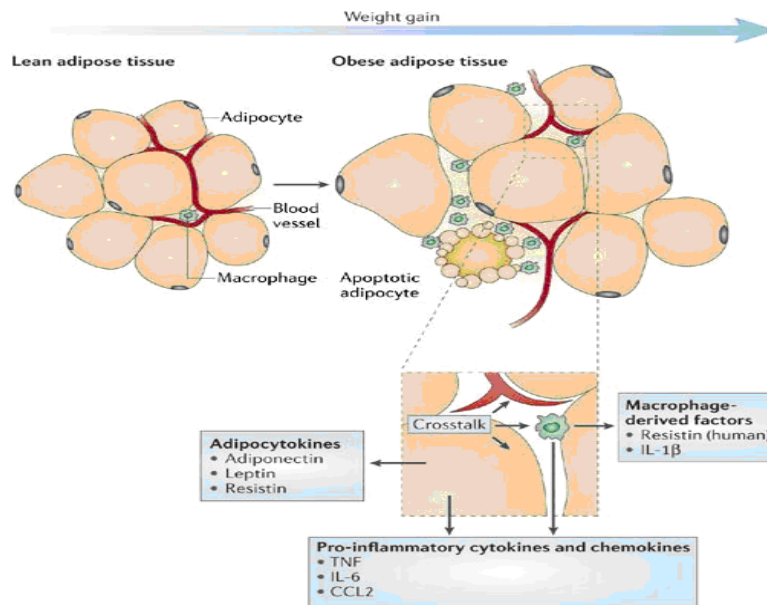


Figura 4.- Adipocitocinas: mediadores entre el tejido adiposo, inflamación e inmunidad. El tejido adiposo involucra funciones además de metabólicas también inmunológicas secretando factores inflamatorios como lo son las adipocitocinas entre otras, Herbert et al, 2006.

2.1 LEPTINA

El avance en el conocimiento de la leptina ha permitido ampliar las perspectivas de la investigación de los agentes que regulan el contenido graso del organismo, el balance energético corporal y los mecanismos que dan inicio al desarrollo puberal. Todo esto ha permitido sugerir que el tejido adiposo es también una glándula endócrina, siendo uno de sus productos principales la leptina. Esta molécula puede intervenir de forma dinámica tanto en la regulación de la ingesta alimentaria como en el balance energético del organismo. La publicación de más de 8000 artículos científicos (Pubmed, enero 2010) sobre la leptina muestra el interés por conocer su fisiología y su potencial participación en la génesis de diversas enfermedades.

La leptina es una proteína plasmática no-glicosilada constituida por 167 aminoácidos y masa de 16 kDa, la cual se transcribe a partir del gen denominado Ob (Villaseñor et al,

2002). El gen de la leptina humana se localiza en el cromosoma 7q31.3 y está constituido por más de 15,000 pares de bases, conteniendo una región promotora para su regulación, tres exones y dos intrones (Zhang et al, 1995). Esta proteína es producida principalmente por el tejido adiposo blanco, aunque otros tejidos participan en su síntesis, tales como el tejido adiposo marrón, endotelio y cartílago. La función con la que se identifica a la leptina parece ser la regulación del peso corporal, la ingesta de alimentos y el aumento de la tasa metabólica (Bokarewa et al 2003; Auwerx et al, 1998). De acuerdo con esto, varios estudios han observado que los niveles plasmáticos de leptina son proporcionales con la masa corporal (Otero et al, 2006).

Por otra parte, actualmente se reconocen múltiples isoformas del receptor para la leptina, tanto en ratas como en humanos; las cuales comprenden tanto formas cortas como largas (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re y Ob-Rf) (ver Figura 5). Desde el punto de vista estructural, el receptor está conformado por 3 regiones: 1) una zona extracelular compuesta de aproximadamente 816 aminoácidos, 2) un dominio transmembranal de 34 aminoácidos y 3) un dominio citoplasmático efector compuesto por 303 aminoácidos, el cual es responsable de la activación de las señales intracelulares. Los receptores humanos y de rata tienen gran similitud en la secuencia de aminoácidos tanto del dominio extracelular (78%) como del intracelular (71%) (Tartaglia et al, 1995).

El receptor más largo corresponde a un polipéptido de alrededor de 1000 aa (Ob-Rb), insertado en la membrana plasmática y presenta dominios extracelular, transmembranal e intracelular; esto último sugiere que puede transducir señales hacia el interior de la célula, el cual adicional a las diferentes isoformas del receptor transmembranal se ha observado una forma que carece de los dominios intracelular y transmembranal (Ob-Re), lo cual posiblemente implique que pueda funcionar como proteína de transporte de la leptina en el plasma (ver Figura 5) (Tartaglia et al, 1995).

Mientras que las formas largas (OB-RL) predominan en el hipotálamo, las formas cortas (OB-Rs) se encuentran en los demás tejidos. Como se observa en la Figura 4, los receptores Ob-Rb (forma larga) parecen mediar los efectos a nivel intracelular, principalmente por intermediación de las proteínas JAK-STAT3 y MAPKs (Matarese et al, 2005).

Por su parte, las isoformas cortas (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd y Ob-Rf) se han relacionado con el transporte de la leptina y con la regulación del sistema inmune (Otero et al, 2005) (ver figura 5).

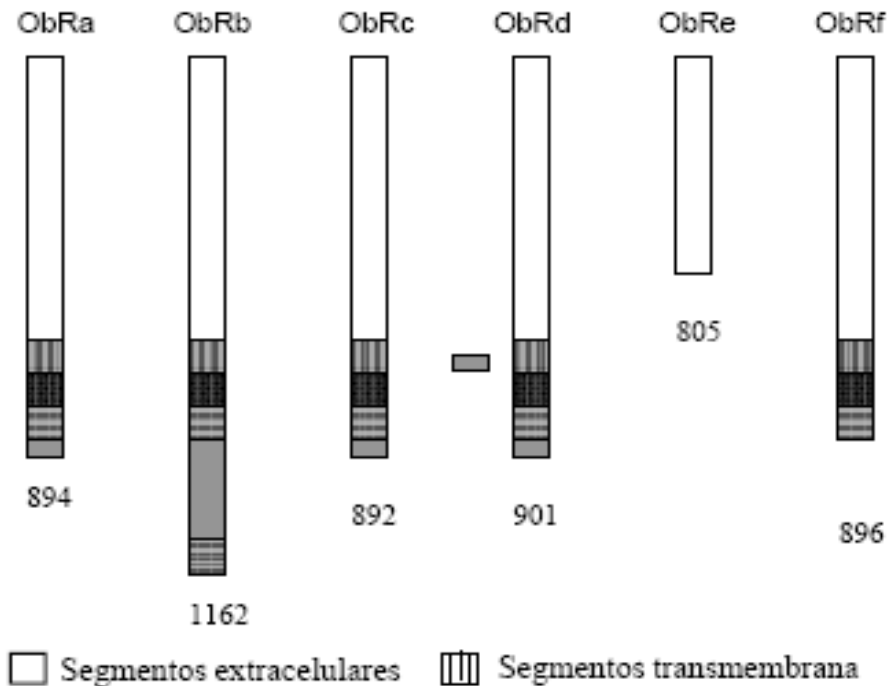


Figura 5. Representación esquemática de la estructura general de los diferentes subtipos de receptores de leptina (ObR). Las regiones de alta homología entre los diversos subtipos están representadas por los mismos símbolos; el número total de residuos de aminoácidos está indicado en la parte inferior del esquema correspondiente a cada subtipo Simon et al, 2002.

En un inicio, la relación entre la leptina y la respuesta inmune había sido sólo teórica, basado en el hecho de que varias células de importancia inmunológica presentaban receptores para la leptina (Otero et al, 2005). Posteriormente, estudios *in vitro* e *in vivo* han confirmado que la leptina puede ejercer diferentes efectos, tales como la diferenciación de linfocitos hacia el fenotipo Th1 (Matarese et al, 2005; Tilg et al, 2006). Debido a su semejanza estructural y por el mecanismo de acción, se ha relacionado el receptor de la leptina con el receptor gp130, el cual forma parte en la familia de las citocinas de la IL-6 (Nakashima et al, 1997). En monocitos y macrófagos, la leptina incrementa la producción

de algunas citocinas pro-inflamatorias tales como TNF- α , IL-6 e IL-12. (Gainsford et al, 1996). También regula la expresión de factores pro-angiogénicos y pro-inflamatorios, como CCL2 y factor de crecimiento endotelial vascular en células madres hepáticas humanas (Alleffi et al, 2005). Se ha observado que el efecto sobre estas células está mediado por la activación de NF-K β y Akt/PI3K (Alleffi et al, 2005).

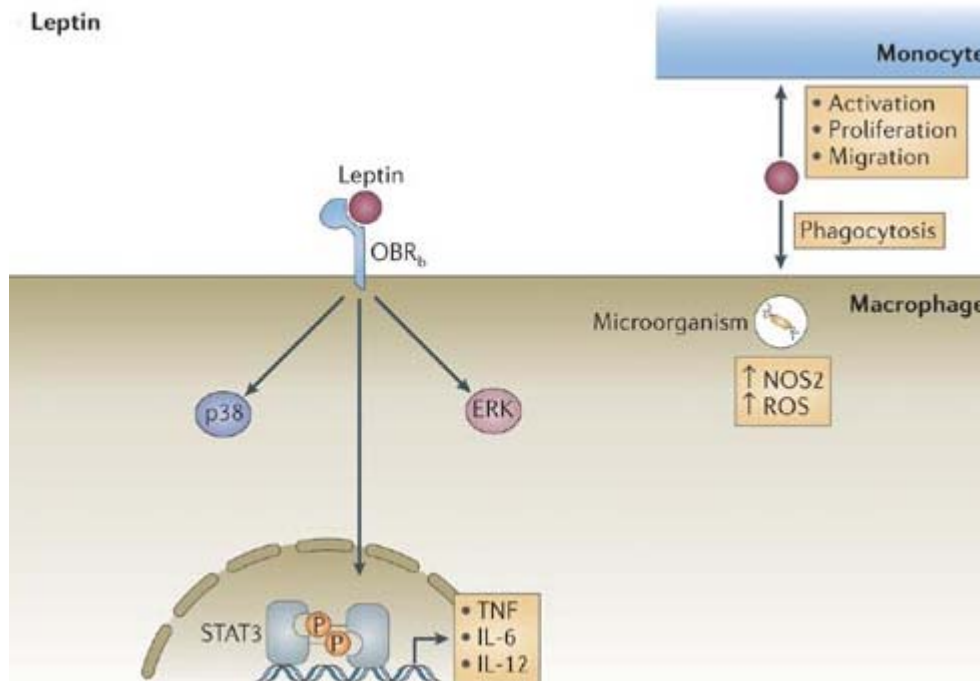


Figura 6.- Ligando y Receptor de Leptina. Leptina se une a su receptor (OBR_b) en células inmunes activa una vía de señalización promoviendo la traslocación de STAT3 al núcleo y la consecuente expresión de citocinas inflamatorias, Herbert et al, 2006.

La leptina puede también activar neutrófilos, inducir un incremento de expresión de CD11b, estimular la proliferación de monocitos de sangre periférica *in vitro* y favorecer la sobreexpresión de marcadores de activación tal como CD25 (también conocido como Il-2R) y CD71 (el receptor transferrina). La leptina induce la secreción de TNF α por macrófagos, efecto que es inhibido por la adiponectina globular vía la cascada de fosforilación de las MAP cinasas (ERK1, ERK2 y p38) (Fantuzzi et al 2005; Matarese et al, 2005). Además, la leptina estimula el reclutamiento de neutrófilos, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y regula la diferenciación de células NK, proliferación, activación y citotoxicidad. Se considera que la mayoría de estos efectos están

mediados a través de la isoforma larga del receptor de leptina (Ob-Rb), la cual se expresa por células endoteliales y varios leucocitos (Tian et al, 2002), sin embargo ha sido escaso el estudio funcional sobre las otras versiones del receptor.

De acuerdo a su papel pro-inflamatorio, la deficiencia de leptina favorecería un bajo nivel de citocinas pro-inflamatorias, menor respuesta Th1 y, en términos generales, la inhibición de la inflamación (Faggioni et al, 2000).

2.2 ADIPONECTINA

La molécula codificada por el gen *Apm1*, que ha sido mapeada en el cromosoma 3 (3q27) y que codifica una proteína de 244 aminoácidos denominada adiponectina. Su estructura consiste en un dominio fibroso semejante al del colágeno y un dominio globular semejante al factor de complemento C1q. La adiponectina existe como un trímero, la forma fibrosa asociada a tres dominios globulares (adiponectina de bajo peso molecular) así como sufrir un corte protelítico dejando solo al fragmento globular. La adiponectina de bajo peso molecular puede dimerizarse formando un hexámero el cual se denomina adiponectina de mediano peso molecular, y esta a su vez oligomerizarse para formar un polímero denominado adiponectina de alto peso molecular. Fue reportada por primera vez en 1995 por Scherer y colaboradores .

La adiponectina, también conocida como Acrp30 o adipoQ, es una proteína expresada exclusivamente en adipocitos diferenciados, y cuyo papel en la respuesta inflamatoria aparentemente es opuesto al efecto de la leptina (ver Figura 7).

Dos receptores para adiponectina han sido identificados de manera relativamente reciente, y se expresan en tejidos sensibles a la insulina, como el músculo esquelético, hígado, páncreas o tejido adiposo. La adiponectina en su forma globular parece activar a ADIPOR1, mientras que ADIPOR2 se relaciona con la forma larga de la adipocitocina (Yamauchi et al, 2003).

Los niveles séricos en humanos de la adiponectina se encuentran entre los 5-10 microgramos por mililitro y aparentemente se encuentra inversamente relacionado a la cantidad de grasa visceral (Comuzzie et al, 2001). En este sentido, se ha observado que los ácidos grasos libres derivados de la grasa visceral parecen inducir efectos en músculo y endotelio a través de estimular la expresión de TNF α . A su vez, la presencia de TNF α

induce señales en el interior del miocito y la célula endotelial, vía la participación de dos tipos de segundos mensajeros citosólicos denominados JNK (Janus-C-terminal kinasas) y MAPK cinasas (cinasas activadoras de la mitogénesis), las cuales bloquean las acciones de la insulina a través de bloquear la señalización de su receptor para facilitar el transporte de glucosa (Frühbeck et al, 2006). Adicionalmente, estas rutas de señalización están relacionadas con la vía inflamatoria más potente conocida como la vía NFκB/IKK, al final del cual se activa al factor nuclear NFκB, este factor induce modificaciones en la expresión génica sobre blancos, induciendo la expresión de las moléculas de adhesión, la resistencia a la insulina, la disfunción endotelial y aterogénesis, entre otras (Frühbeck et al, 2006). Todas estas acciones al parecer pueden ser inhibidas por la presencia de niveles elevados de adiponectina, lo cual sugiere que el TNFα y la adiponectina podrían ser considerados antagonistas moleculares.

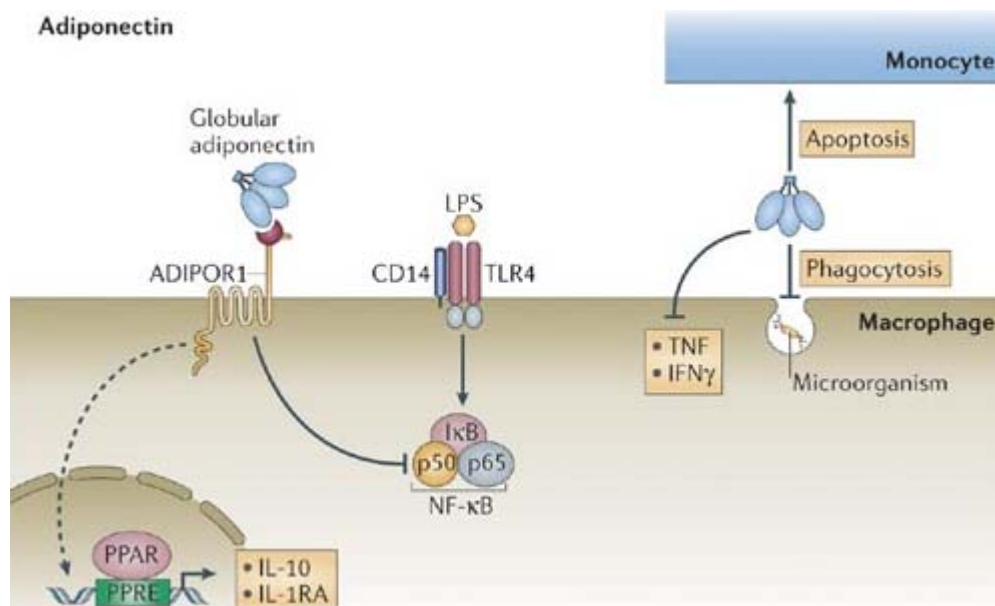


Figura 7.- Receptor, ligando y función de adiponectina en la inflamación. Adiponectina se une a su receptor (ADIPOR1) en células inmunes activa una vía de señalización promoviendo la expresión de citocinas anti-inflamatorias, e inhibiendo la activación de NF-κb, (Herbert et al, 2006)

La interacción intracelular entre la adiponectina y el TNFα ha sido bien caracterizada en macrófagos y células endoteliales (Ouchi et al, 1999), (ver Figura 7). En este modelo, se ha observado que la presencia de adiponectina parece inhibir la expresión

de NFkB y, en consecuencia, las moléculas de adhesión ICAM y VCAM en la célula endotelial. Así también, la adiponectina parece inhibir la proliferación y migración de células de músculo liso vascular y bloquear la expresión del receptor “scavenger” tipo A en macrófagos, inhabilitándolos para englobar LDL oxidadas (Goldstein et al, 2004). En su conjunto, estos efectos sugieren que la adiponectina favorece una respuesta disminuida que alivia los desordenes metabólicos, similares a la obesidad, síndrome metabólico y resistencia a la insulina.

En resumen, se sugiere que la adiponectina viaja desde la grasa por el torrente sanguíneo y penetra al endotelio vascular para bloquear los tres pasos más importantes de la formación de la placa ateromatosa:

- a) Bloquea la migración y activación de las células de músculo liso vascular,
- b) Bloquea la expresión de las moléculas de adhesión ICAM y VCAM, bloqueando de esta manera la penetración de monocitos al endotelio y su diferenciación en macrófagos
- c) Bloquea en la activación de los propios macrófagos vía la inhibición de la expresión de sus receptores scavenger y de esta manera evitar la captura de LDL oxidadas y la formación de la célula esponjosa.

Es por esto que en la actualidad, el estudio del síndrome metabólico reconoce la participación de factores de las vías endocrino-metabólicas, protrombóticas y pro-inflamatorias donde la perturbación del tejido adiposo, puede generar alteraciones tanto metabólicas como inflamatorias.

Otros efectos que la adiponectina podría inducir son: estimulación de la expresión de citocinas anti-inflamatorias como la interleucina 10 (IL-10) y el receptor antagonista de IL-1 (IL-1RA). La adiponectina también reduce significativamente la capacidad fagocítica de los macrofagos. Finalmente, esta adipocitocina parece disminuir la activación y proliferación de linfocitos T limitando su respuesta durante la inflamación (Diez et al, 2003).

2.3 RESISTINA

La resistina es un polipéptido monomérico de 12.5 kDa que se puede formar de oligómeros. Se sugiere que se sintetiza por los macrófagos del tejido adiposo, aunque se desconoce gran parte de su fisiología. Se le dio este nombre para resaltar su participación de la resistencia a la insulina. (Steppan et al, 2001)

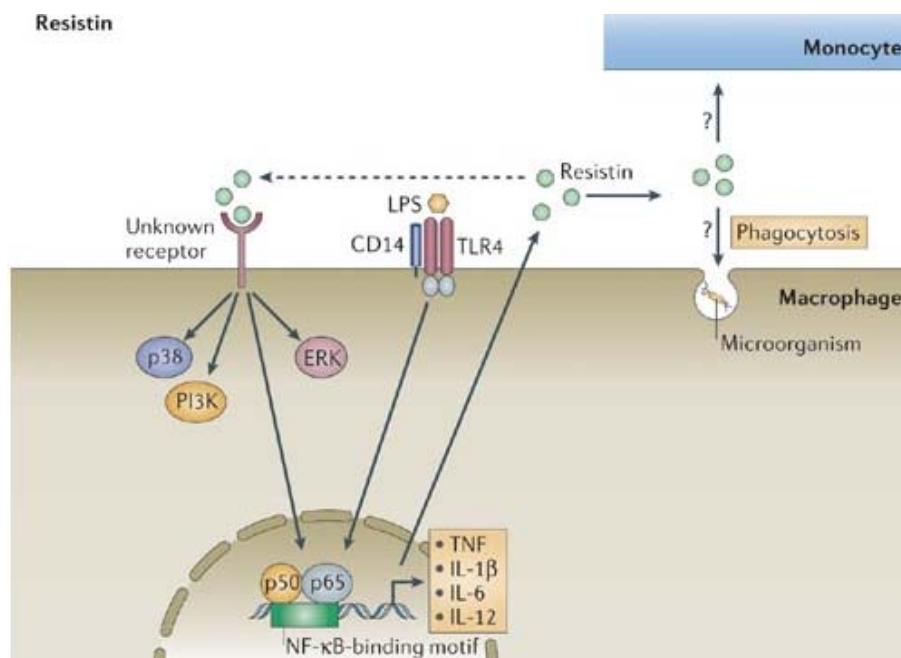


Figura 8.- Activación a través de resistina a su receptor. Resistina se une a su receptor que no es conocido, en células inmunes activa una vía de señalización promoviendo la activación de NFκb y la consecuente expresión de citocinas inflamatorias, Herbert et al, 2006

Según los estudios *in vitro*, la resistina muestra una potente acción proinflamatoria y se sabe que este efecto es dependiente de NFκβ; por esto, se sugiere que antagoniza los efectos de la adiponectina (Borakewa et al, 2005). Sin embargo, las acciones inmunológicas directamente causadas por la resistina no son totalmente conocidas, en especial las relacionadas con la inmunidad adaptativa. Se reconoce que la resistina activa los macrófagos, favoreciendo la liberación de citocinas proinflamatorias (TNFα, IL-12,) (Silswal et al, 2005; Kaser et al, 2003). Un aspecto particularmente interesante es el hecho de que sus efectos muestran una potencia igual o superior a las endotoxinas, como LPS (Lerkhe et al, 2004) (ver Figura 8). La resistina también podría influir en la inflamación al

estimular la expresión de moléculas de adhesión vascular y favoreciendo la infiltración de leucocitos (Verma et al, 2003).

2.4 ADIPOCITOCINAS Y ARTRITIS REUMATOIDE

En base a lo descrito, las adipocitocinas presentan múltiples efectos sobre los mecanismos de regulación de la inflamación local y sistémica. En este contexto, se puede sugerir que los procesos autoinmunes, como la AR podrían verse modificados por situaciones tan comunes como la obesidad o alteración de los niveles de adipocitocinas. De ahí que resulte interesante el estudiar la posible relación entre los niveles de las adipocitocinas y la actividad clínica de pacientes con AR.

A ese respecto, se han realizado varios estudios para evaluar la posible participación de las adipocitocinas (Tabla 2) en la AR, sin embargo los resultados han sido muy heterogeneos e incluso controversiales. Mientras algunos grupos observaron una clara correlación entre el incremento del nivel de leptina/resistina con la actividad de la enfermedad, la predisposición a la cronicidad y respuesta al tratamiento convencional, en otros estudios no se observó esta asociación. Entre los factores que pudieran ayudar a explicar la heterogeneidad de estos estudios se puede mencionar: el diseño de los estudios clínicos, la heterogeneidad de los pacientes, el índice de masa corporal (IMC) de los pacientes, las diferencias geográficas y medioambientales de los sujetos, las diferencias técnicas en las determinaciones bioquímicas. Todo esto resalta la importancia de parear las poblaciones de estudio, al tiempo de realizar una evaluación integral, tanto de la respuesta clínica como de los pro-inflamatorios (citocinas), si queremos describir la posible asociación con los niveles de las adipocitocinas.

Tabla 2.- Relación adipocitocinas y Artritis Reumatoide.

AÑO	NO.	EDAD	SEXO	PROTEÍNA	IMC	DAS28	DURACIÓN	CONCLUSIONES
1999	58 (55)	25-59	¿?	13.7± 9.4 Leptina	25 vs 24 ctr	11.3 (>2.7) 17.8 (<2.7) [1.8-3.6]	9.5± 9.5	No diferencias entre controles y pacientes. Correlación con BMI
2002								
2003	76 (42)	64±12 (42±14)	48/28 (22/12)	6.2±1 (5.2±1.2) (2±0.6)	--	Erosivo vs non-erosivo	14-8	Aumento significativo de leptina plasmática en pacientes. Menor leptina sinovial en pacientes, se sugiere su consumo
2005	68 (32)	9 (9)	43/25 (21/11)	7.8± 4.4 (8.6± 5.3)	17 (19)	--	--	No hay diferencias significativa entre controles y pacientes. Relación de leptina con edad y sexo
2005	38	47.6±2 (44.3±2)	20/18 (26/6)	14.3±1.9 (9.2±1.3)		--	8±7	Mayor nivel de leptina en pacientes aunque no fue significativa
2005	31 (18)	41±15 (38.4)	11/20 (9/9)	6 vs 4.2 15 vs 13.4	25 vs 23 H 26 vs 22 M	48% < 3.2 52% > 3.2	6.7 (1-11)	No hay diferencia significativa, ni cambio después de 2 semanas con anti-TNF
2006	31 (18)	46±14 (48±16)	22/9 (10/8)	33.9±7.3 (13.3±3) ELISA	26±0.6 (24.3±0.8)	--	--	Diferencia significativa en niveles de leptina, adiponectina y visfatina
2006	32		30/2	5±1	22.8±0.8	--	--	Tratamiento con adalimumab por 16 sem no modificó nivel de leptina
2006	50 (34)	56.3±12 (53±12)	41/9 (28/6)	53.2±37 (23±17) ELISA	26.8±5.7 (25.8±3.6)	<5.1 (19) >5.1 (31)	10±9	Nivel mayor de leptina en pacientes, pero no relaciona con actividad o con tratamiento (MTX, glucocort)
2007	41 (25)	49±12 (51±13)	33/8 (19/6)	3.91±6.1 (4.94±6.4) ELISA	24.2±3 (23.7±3)	--	6.7	No hay diferencia entre controles y pacientes
2007	50	40.7±10	Mujeres	14.2±11 (+active 7±3.4) (-activo)	<25 (20-22)	Actividad alta (4.8±0.9, 26) Baja active (2.4±0.7, 24)	0.1-3	Hay diferencia significativa entre pacientes activos y poco activos. El nivel de leptina baja tras 8-13 meses de tratamiento DMARD.
2007	30 (30 OA)	60.2±15	Mujeres	11.2±25	Ranks BMI	3.3-4.8 (15) >4.8 (15)	2-35	No hay correlación entre leptina e IMC, edad, actividad. Posible relación con Índice de Filtración Glomerular
2008	37	58.6±20	¿?	26.7 (M) 8.6 (H) [5-35]	26.4±9	<5.1, 46% >5.1, 54%	2-26	No hay relación entre nivel de leptina y actividad. Posible relación en pacientes >10 años
2003	52	67.4- 73.9	39/13	2.2 µg/mL adiponectina	27.8	---	---	Entre pacientes con OAR Y AR, no hay diferencia entre los niveles.
2006	31	----	----	----	----	----	---	Se encuentran en niveles elevados respecto a controles
2003	52	67.4- 73.9	39/13	resistina[74.6] ng/ml	27.8	---	----	Hay correlación entre VSG y PCR. Se encontraba 10 veces más en pacientes con AR que en pacientes con OAR
2006	31	--	---	Resistina	----	----	---	Niveles iguales que en donadores

DMARD medicinas que cambian el curso de artritis reumatoide, OAR osteoartritis, PCR proteína C reactiva, IMC índice de masa corporal, VSG velocidad de sedimentación global, DAS28 índice de actividad de AR.

II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Desde hace tres años nuestro grupo de trabajo, en colaboración con los Hospitales Generales de Cuernavaca y de México, se ha enfocado en la evaluación clínica e inmunológica de los pacientes con AR, con el objetivo de identificar nuevos blancos terapéuticos y/o describir nuevos biomarcadores de su desarrollo o respuesta al tratamiento. En este contexto, en un estudio previo (Gonzalez, 2007) se evaluaron los niveles plasmáticos y de líquido sinovial de leptina en una población de pacientes con AR establecida. En ese trabajo se observó una concentración significativamente mayor de leptina circulante en sangre y líquido sinovial de pacientes, con respecto a sangre de donadores sanos. Así mismo los niveles de leptina se asociaron con un mayor índice de actividad de la enfermedad (DAS28). Cabe hacer notar que las poblaciones de estudio estuvieron controladas ya que el grupo control de donadores como de pacientes fueron mayoritariamente mujeres con sobrepeso (IMC 28.5 ± 3).

Sin embargo, en ese estudio la población de pacientes con AR fue pequeña, así como sólo se consideró la participación de la leptina. Con la idea de obtener una imagen integral de las adipocitocinas y factores pro-inflamatorios, se decidió ampliar este estudio previo, para evaluar los niveles de otras 2 adipocitocinas (adiponectina y resistina), así como evaluar los niveles de citocinas pro-inflamatorias (TNF α , IL-17 e IL-6). Los resultados de este estudio podrían sugerir que los factores adipogénicos participan durante la inflamación crónica de pacientes con AR.

Resulta importante resaltar que el acercamiento clínico será de un enorme valor, toda vez que este tipo de evaluaciones no han sido realizadas con pacientes mestizos mexicanos, y por resultados preliminares de nuestro laboratorio, se podría considerar que la población de pacientes mexicanos tiene una respuesta muy diferente a la de poblaciones caucásicas, tanto en el desarrollo de la patología como en su respuesta al tratamiento. Por todo lo anterior, los resultados del presente estudio podrían ser de utilidad al especialista en el momento de hacer un diagnóstico y dar seguimiento de los pacientes. Finalmente, los resultados de este estudio harían pertinente la caracterización molecular de los mecanismos del efecto de las adipocitocinas sobre las células del sistema inmune.

III. HIPOTESIS

Las evidencias previas sugieren que las adipocitocinas (leptina, adiponectina y resistina) participan en la respuesta inflamatoria, proponemos que la modificación en los niveles perfil de las adipocitocinas está asociada con la respuesta clínica y con la expresión diferencial de citocinas pro-inflamatorias en pacientes con AR.

IV. OBJETIVO

Evaluar la relación entre las adipocitocinas, las citocinas pro-inflamatorias y la respuesta clínica de pacientes con artritis reumatoide.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar los niveles de adiponectina, leptina y resistina) en sangre de donadores y pacientes con AR .
- 2.- Determinar el nivel de citocinas pro-inflamatorias circulante (TNF α , IL-6, IL-17)
- 3.- Evaluar la posible asociación entre las adipocitocinas, citocinas pro-inflamatorias y actividad clínica de pacientes con AR.

V. METODOLOGÍA

5.1 COLECTA DE MUESTRAS

Pacientes

Las muestras de sangre de los pacientes con Artritis Reumatoide se reclutaron en dos centros hospitalarios: el Hospital General de Cuernavaca “Jose G. Parres” y el Hospital General de México (2006-2008), en colaboración con los responsables del servicio de Reumatología, y en función de los criterios de inclusión y exclusión. (ver Apéndice).

Los criterios de inclusión para este estudio fueron los siguientes:

1. Pacientes que hayan asistido a las consultas cotidianas en los hospitales citados.
2. Pacientes que hayan sido diagnosticado como AR, según los criterios del ACR, 1987.
3. Pacientes cuyo diagnóstico haya sido corroborado por análisis de laboratorio (FR, PCR, VSG).
4. Pacientes que hayan voluntariamente aceptado participar en el presente estudio y donar una muestra de sangre.
5. Pacientes que hayan voluntariamente aceptado determinar sus parámetros corporales: peso y talla.
6. Pacientes mayores de 18 años y sin otras enfermedades inflamatorias u obesidad mórbida.
7. Pacientes con AR activa que reciban un tratamiento a base de FARMES y cuyo tratamiento no haya sido modificado durante los últimos tres meses previos al estudio

Criterios de exclusión para este estudio fueron:

1. Pacientes que no asistieron a las consultas en el Hospital
2. Pacientes sin diagnóstico o con diagnóstico incompleto.
3. Pacientes con alguna otra patología. (p. ejemplo, Diabetes mellitus)
4. Pacientes que no aceptaron participar en el presente estudio: donar sangre y/o medir parámetros corporales.

5. En caso de pacientes con sexo femenino que estuvieran embarazadas o en período post-menopáusicos
6. Pacientes con otros tipos de artropatías.

Donadores.

Las muestras sanguíneas de donadores fueron obtenidas con colaboración del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea (CETS) de Morelos. Con el fin de comparar grupos de individuos con características semejantes, se seleccionaron sólo aquellos donadores que cumplieron con las siguientes características:

- a) Asistir al CETS al servicio de donación de sangre.
- b) Aceptar voluntariamente participar en el presente protocolo de investigación.
- c) Ser de género femenino y con edad entre 30 y 60 años.
- d) Estar sana y ser negativa para las pruebas básicas para la donación de sangre (VIH, Hepatitis, Herpes, Brucella, etc.).
- e) No cursar con enfermedades inflamatorias.

Las muestras de sangre de los pacientes se obtuvieron el mismo día de la consulta y evaluación clínica de cada paciente, valoración que fue almacenada en una base de datos única y con acceso electrónico por parte de los colaboradores (<http://www.zoho.com>).

La toma de sangre se realizó en Vacutainer/EDTA estériles, y el mismo día, se aisló el plasma y las células mononucleares. Para su separación en condiciones de esterilidad, la sangre se colectó en tubos de 15 ml estériles, y se centrifugaron durante 7 minutos a 1,500 rpm a temperatura ambiente. Se hicieron alícuotas del plasma y de las células y estas se almacenaron a -70° hasta su análisis, permitiendo generar un banco de plasmas para el estudio de citocinas así como de los marcadores de la enfermedad (anti-PCC, factor Reumatoide) y un banco paralelo de DNA para otros estudios como la tipificación de genes asociados a la enfermedad. Con el fin de evitar la contaminación de las muestras una vez descongeladas, se añadió 0.01% de azida de Sodio (NaN_3) previo a su almacenamiento a 4°C.

5.2 OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLOS DE CUANTIFICACIÓN

(ELISA)

En este estudio se utilizó la técnica de ELISA para determinar los niveles de Leptina, adiponectina, resistina, IL-17, IL-6 y TNF α en el plasma de donadores y pacientes con AR. El principio de la técnica es mostrado en la Figura 9.

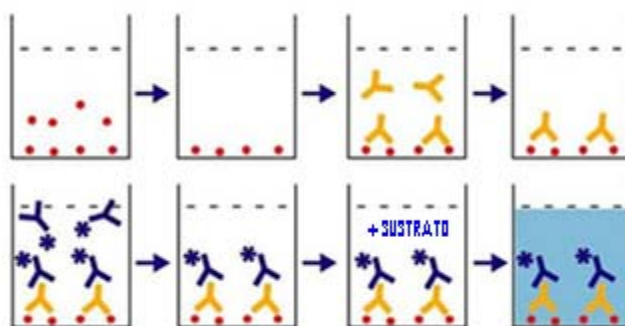


Figura 9. Protocolo general de la técnica de ELISA. Inicialmente, se incubó la placa de 96 pozos con la dilución de plasma, permitiendo el acoplamiento, entre otras, las citocinas en estudio (representado por puntos rojos). Posteriormente, se bloquea los espacios no ocupados por las citocinas. A continuación, se incubó con el anticuerpo específico de la citocina en cuestión (en amarillo) y se lava el exceso de anticuerpo. Luego se agrega un anticuerpo secundario acoplado con la enzima HRP (asterisco azul). Finalmente, se agrega el sustrato de la enzima, lo cual genera un cambio de color, que puede cuantificarse en el lector de ELISA.

En la Figura 10 se esquematiza el diseño general de los ensayos por ELISA empleados para la evaluación de todas las muestras plasmáticas. El volumen para cada pozo fue de 100 μ l.

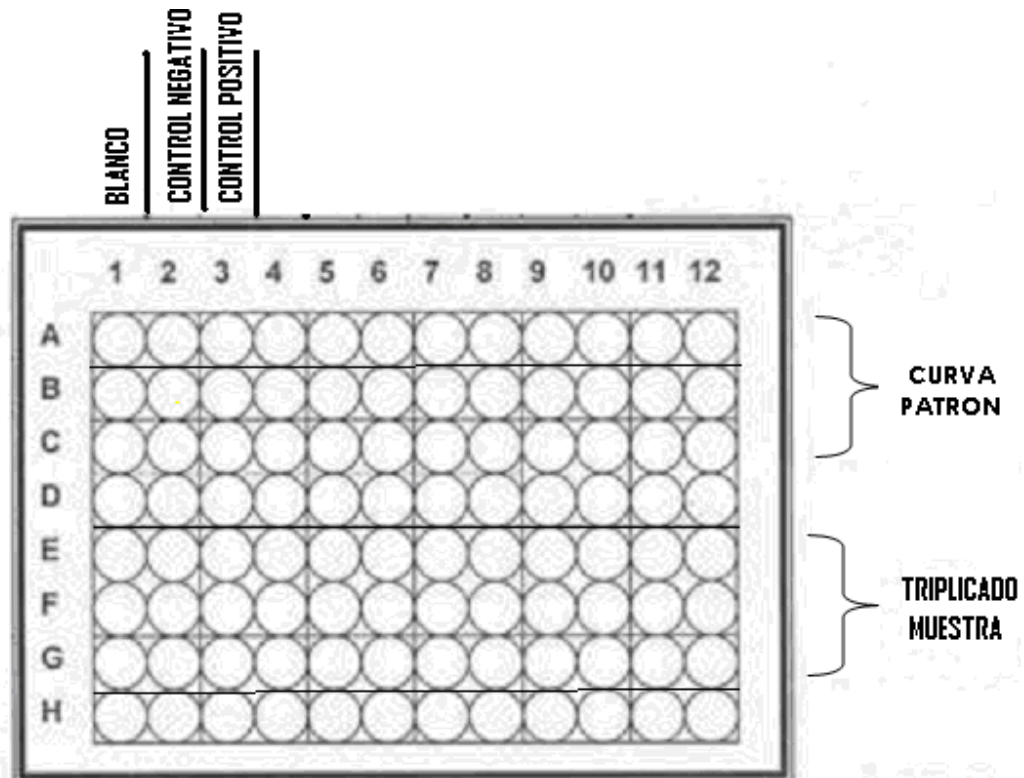


Figura 10.- Diseño general de los ensayos para cuantificación de citocinas por ELISA. Se muestra la región reservada para la curva estándar y los pozos destinados en las muestras plasmáticas.

A) Pre-Incubación

A los pozos A, B y C de la columna 1 (ver Figura 10), se agregó 100 μl de NaHCO_3 y fueron considerados como el blanco del sistema. El control negativo (pozos A, B y C de la columna 2) estuvo constituido por plasma control en presencia de anticuerpo irrelevante (Un anticuerpo con el que se asegurara que no hubiera un falso positivo). Por su parte, en el control positivo se utilizó el plasma control, correspondiente a una muestra de donador, en presencia del anticuerpo específico. Con el fin homogeneizar los resultados entre placas, se conservó el mismo plasma control para todos los ensayos. Asimismo, la curva patrón sirvió para estandarizar los resultados generales. Finalmente, las muestras de donadores y pacientes se distribuyeron en el resto de los pozos (D-H, 1-12), en ensayos por triplicado. Una vez que se adicionaron las muestras de plasma, se selló la caja con plástico y se almacenó durante toda la noche a 4°C.

Para cada determinación se emplearon ensayos por triplicado, donde el resultado de cada muestra correspondió al promedio \pm desviación estándar. La concentración de las citocinas fue determinado por la interpolación en la curva patrón.

B) Bloqueo y primer anticuerpo.

Posteriormente a la incubación en frío, se lavaron las placas 3 veces con 200 μ l de amortiguador de lavado (PBS, Tween-20 0.05%). Después de cada lavado se removió el exceso de amortiguador, golpeando la placa sobre un papel absorbente. A continuación, se bloquearon los pozos por la incubación con 100 μ l/pozo de una solución de leche descremada al 5% en buffer de lavado (amortiguador de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Al finalizar la incubación, se volvieron a lavar las placas 4 veces con buffer de lavado. Posteriormente, se agregaron 100 μ l de una solución del anticuerpo específico para la citocina (primer anticuerpo), (véase Resultados) en la solución del amortiguador de bloqueo. El 1er. anticuerpo se incubó durante una hora a temperatura ambiente.

C) Anticuerpo secundario

A continuación, los pozos se lavaron 4 veces con el amortiguador de lavado y, después, se adicionó la solución del segundo anticuerpo, los cuales se encuentra acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP). De igual forma que el primer anticuerpo, la solución del segundo anticuerpo se hizo con amortiguador de bloqueo y se agregaron 100 μ l de esta solución en cada pozo, donde se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

D) Revelado

El siguiente paso consistió en la preparación de la solución de revelado [8 mg de OPD (ortofenilendiamina, P9029, J.T. Baker), 80 μ l de peróxido de hidrógeno, y 7.91 ml de citrato de Sodio pH 5.0]. Posterior al lavado final de la placa (4 veces) con buffer de lavado, se agregaron 100 μ l/pozo de la solución de revelado fresca y se mantuvo en incubación, en la obscuridad, durante 1 hora. Posteriormente, se detuvo la reacción por adición de 100 μ l de H₂SO₄ 4N (J.T. Baker). Finalmente, unos minutos después de detener

la reacción, se procedió a leer las placas en un lector de ELISA (Ultramak ELISA, Bio Rad) a una longitud de onda de 490 nm.

5.2.1 ELISA PARA LEPTINA

Para la determinación de los niveles de leptina, se realizaron ensayos con diferentes diluciones de plasma, concluyendo que la mejor condición fue la dilución 1:8000. Para todos los ensayos de determinación de leptina se agregaron 100 μ l de plasma 1:8000 en buffer de NaHCO₃. Tanto los plasma de donadores como de pacientes fueron diluidos de igual manera para determinar los niveles de leptina en sangre.

Como se explicó en el protocolo general para la realización de ELISA, las muestras de plasma fueron incubadas durante toda la noche a 4⁰C en la placa de 96 pozos. Posteriormente al período de bloqueo, se adicionó como primer anticuerpo Ob A-20, rabbit polyclonal IgG 200 μ g/ml (Santa Cruz Biotech.), a una dilución de 1:800 en leche al 5% en PBS-Tween-20, y se incubó en cada pozo de la placa durante 1 hora. Tras los lavados en solución de PBS-Tween-20, se adicionó como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo-HRP (Santa Cruz) a una dilución final de 1:500 en leche al 5% en PBS-Tween-20. La reacción colorida y su evaluación se realizó en las condiciones descritas en la sección anterior.

Para la determinación de la concentración de leptina, se estableció una curva patrón con leptina recombinante humana (Sigma. Cat: 195807, Lot: 6424H 500 UG.) con concentraciones crecientes desde 10 hasta 60 ng, (ver Resultados). De esta curva se obtuvieron las siguientes constantes: $m= 0.001175$ y $b= 0.0218$, ($n= 3$).

5.2.2 ELISA PARA ADIPONECTINA

En el proceso de estandarización, se observó que la dilución de plasma 1:25,000 en amortiguador de carbonatos pH 9.3 nos dio resultados reproducibles y sensibles al efecto de dilución (ver sección de Resultados).

Por su parte, el primer anticuerpo empleado fue anti- Acrp30 goat polyclonal IgG 200 µg/ml, clona G17 (Santa Cruz Biotech.). Este anticuerpo se empleó a una dilución de 1:1000 en leche al 5% en PBS-Tween-20, y se adicionaron 100 µl de la solución en cada pozo de la placa durante 1 hora. Tras los lavados en solución de PBS-Tween-20, se adicionó el anticuerpo secundario correspondiente a anti-IgG de cabra-HRP (Santa Cruz Biotech) a una dilución final de 1:1000 en leche al 5% en PBS-Tween-20.

Para la determinación de la concentración de Adiponectina, se estableció una curva patrón con adiponectina recombinante humana (PeproTech. No. Cat. 450-24. Lot 1107331k2007) con concentraciones crecientes de 1 hasta 10 ng. De esta curva se obtuvieron las siguientes constantes: $m= 0.04542$ y $b= 0.0899$ ($n= 3$).

5.2.3 ELISA PARA RESISTINA

Para la determinación de los niveles de esta citocina, se observó que la dilución de plasma 1:50000 nos daba lectura que se consideraron optimas para el estudio.

Para lo cual se agregaron 1 µl de plasma en 12.5 ml de NaHCO₃, seguida de una dilución en cantidades equitativas (700 µl de dilución de suero: 700 µl de NaHCO₃), para obtener una dilución de 1:25,000 de igual forma se hizo la siguiente dilución, la cual nos permitió llegar a la dilución deseada, 1:50,000.

Tanto los plasma de donadores y pacientes fueron diluidos exactamente igual para determinar los niveles de resistina en sangre.

Como se explicó antes, las muestras de plasma fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C, para posteriormente, lavar con el buffer de lavado y bloquear en leche clavel al 5% en PBS-Tween-20. El primer anticuerpo (anti-resistina, mouse monoclonal IgG₁ 200 µg/ml) se preparó a una dilución de 1:1000 en leche al 5% en PBS-Tween-20, y se agregaron 100 µl de la solución en cada pozo de la placa durante 1 hora. Tras los lavados en solución de PBS-Tween-20, se adicionó el anticuerpo secundario (anti-IgG de mouse - HRP, Santa Cruz Biotech) a una dilución final de 1:1000 en leche al 5% en PBS-Tween-20.

Como se mencionó en el protocolo para ELISA indirecta se obtuvo una reacción la cual fue leída a través del lector de placas de ELISA, para posteriormente realizar su análisis.

Para la determinación de la concentración, se preparó una curva patrón con resistina recombinante humana (PeproTech. Cat.# 450-19. Lot# 0604235 D3007) con concentraciones crecientes de 0.1 hasta 2 ng. De esta curva se obtuvieron las siguientes constantes: $m = 0.07621$ y $b = 0.08905$ ($n = 3$).

5.2.4 ELISA PARA TNF α

Para la determinación de los niveles de esta citocina, en pacientes con AR y donadores se empleó el plasma a una dilución de 1:6000 (ver sección de Resultados. Para lo cual se agregaron 1 μ l de plasma en 12.5 ml de NaHCO₃, seguida de dos diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ (700 μ l de dilución de suero: 700 μ l de NaHCO₃). Tanto el plasma de donadores y de lospacientes con AR fueron diluidos exactamente igual para determinar los niveles en sangre

El primer anticuerpo (anti-TNF α , goat polyclonal IgG 200 μ g/ml) se preparó a una dilución de 1:600 en leche al 5% en PBS-Tween-20, y se agregaron 100 μ l de la solución en cada pozo de la placa durante 1 hora. Posteriormente, tras los lavados en solución de PBS-Tween-20, se adicionó el anticuerpo secundario (Donkey anti-IgG de goat-HRP, Santa Cruz) a una dilución final de 1:1000 en leche al 5% en PBS-Tween-20.

Como se mencionó en el protocolo para ELISA indirecta se obtuvo una reacción la cual fue leída a través del lector de placas de ELISA, para posteriormente realizar su análisis.

Para la determinación de la concentración, se preparó una curva patrón con TNF α recombinante humana (PeproTech. No: Cat.# 300-01A. Lot# 0604CY25 K155) con concentraciones crecientes de 1 hasta 8 ng. De esta curva se obtuvieron las siguientes constantes: $m = 0.1844$ y $b = 0.09172$ ($n = 3$).

5.2.5 ELISA PARA INTERLEUCINA-17 (IL-17)

Para la determinación de los niveles de IL-17, se observó que la dilución de plasma 1:8000, daba las lecturas optimas para el estudio de esta proteína en pacientes con AR (ver

sección de Resultados), para lo cual se agregaron 1 μ l de plasma en 8 ml de NaHCO_3 y se vortexeo para obtener una mezcla uniforme.

Tanto los plasma de donadores y pacientes fueron diluidos de igual manera para determinar los niveles de la citocina en sangre.

Como se explicó en el protocolo para la realización de ELISA indirecto, las muestras de plasma fueron incubadas durante toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$, para su absorción, posteriormente, se lavó con solución de lavado y se bloqueó en leche carnation al 5% en PBS-Tween-20.

El primer anticuerpo (anti IL-17, rabbit polyclonal IgG 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se preparó a una dilución de 1:800 en leche al 5% en PBS-Tween-20, y se agregaron 100 μ l de la solución en cada pozo de la placa durante 1 hora. Posteriormente, tras los lavados en solución de PBS-Tween-20, se adicionó el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo-HRP, Santa Cruz Biotech) a una dilución final de 1:500 en leche al 5% en PBS-Tween-20.

La reacción obtenida fue evaluada se realizo en idénticas condiciones a las descritas en el protocolo descrito para ELISA indirecto.

Para la determinación de la concentración de IL-17, se preparó una curva patrón con IL-17 humana (Peprotech. Cat: 200-17, Lot: 03284.) con concentraciones crecientes de 1 hasta 32 ng. De esta curva se obtuvieron las siguientes constantes: $m = 0.005273$ y $b = 0.1522$ $n = 3$

5.2.6 ELISA PARA INTERLEUCINA-6 (IL-6)

Para la determinación de los niveles de IL-6, se observó que la dilución de plasma 1:6000, daba las lecturas optimas para el estudio de esta proteína en pacientes con AR (ver sección de Resultados), para lo cual se agregó 1 μ l de plasma en 6 ml de NaHCO_3 y se mezcló para obtener una mezcla uniforme.

Tanto los plasma de donadores y pacientes fueron diluidos de igual manera para determinar los niveles de Interleucina 6 en sangre.

Como se explicó en el protocolo para la realización de ELISA indirecto, las muestras de plasma fueron incubadas durante toda la noche a 4 $^{\circ}\text{C}$, para su absorción.

Posteriormente, se lavó la placa con solución de lavado y se bloqueó en leche clavel al 5% en PBS-Tween-20.

El primer anticuerpo (anti IL-6, mouse polyclonal IgG 200 µg/ml, Santa Cruz Biotech) se preparó a una dilución de 1:800 en leche al 5% en PBS-Tween-20, y se agregaron 100 µl de la solución en cada pozo de la placa durante 1 hora. Tras los lavados en solución de PBS-Tween-20, se adicionó el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo-HRP, Santa Cruz) a una dilución final de 1:1000 en leche al 5% en PBS-Tween-20. La reacción colorida y su evaluación se realizó en idénticas condiciones a las descritas en la sección anterior.

Para la determinación de la concentración de IL-6, se preparó una curva patrón con leptina recombinante humana (Preprotech Sigma. Cat: 200-06 Lot: 0203B16 F2508.) con concentraciones crecientes de 0.1 hasta 6 ng. De esta curva se obtuvieron las siguientes constantes: $m = 0.001175$ y $b = 0.0218$, ($n = 3$)

5.3 EVALUACIÓN CLÍNICA Y DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS

La valoración clínica de los pacientes se realizó en base a los criterios internacionales (ACR1987), de acuerdo a la escala conocida como DAS28 que nos califica la actividad clínica que tiene el paciente con AR. Esta evaluación fue realizada con la colaboración por el Dr. Daniel Xibille, encargado del Servicio de reumatología del Hospital General de Cuernavaca “José G. Parres” para todos los pacientes.

El análisis se realizó a través del plasma de pacientes con AR, que previamente había sido obtenido en el procesamiento de muestras, a través de análisis de Laboratorio, los parámetros estudiados y analizados fueron el factor reumatoide y los anti péptidos citrulinados.

5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó a través del programa estadístico PRISM v5.01, utilizando las pruebas estadísticas, One way Anova Spearman y Mann Whitney.

5.5 REACTIVOS

Tabla 3.- Reactivos y soluciones

NOMBRE	COMPOSICION	CONCENTRACION/pH
Bicarbonato de sodio	-8.4 g NaHCO ₃ -100ml agua destilada	0.1 M, Ph 9.6 ajustado con NaOH 1N
Leche	-0.5g leche clavel sin grasa -10 ml PBS Tween-20	5%
PBS Tween-20 (solución de lavado)	-PBS 1X: 8 g NaCl 0.2 g KCl 1.2 g Na ₂ P0 ₄ 0.2 g KHPO ₄ -Tween-20 700µl	pH 7.4 ajustado con HCl 1N, aforado 1 litro 0.007%
Solucion de revelado:	-7.91 ml de citrato de sodio: 2.941 de citrato de Sodio 100 ml de Agua destilada -80µl de H ₂ O ₂ . -80 mg OPD (Ortofenilendiamina)	pH 5 ajustado con Acido Citrico 0.1M
H ₂ SO ₄	- 21.53 ml H ₂ SO ₄ -100 ml agua destilada	4 N
Azida de Sodio	- 1g de azida de Sodio - 100 ml de Agua Milliq	1%

VI. RESULTADOS

6.1 POBLACIONES DE ESTUDIO.

Este estudio se realizó en una población de 131 pacientes y 90 donadores, el IMC, de los pacientes como se puede ver en la tabla nos indica que la población de estudio es obesa. Los pacientes en promedio tienen una enfermedad activa (DAS 4.6), una edad promedio de 46 años, una proporción de género de 15:1 es decir para cada 15 mujeres hay un hombre.

Tabla 4.- Datos demográficos

	Pacientes (n = 131)	Donadores (n = 90)	p
Género (F/M)	123/8	85/5	ns
Edad (DE)	46 (12)	32.6 (8.74)	P<0.05
IMC ^b (DE)	26.7 (4.26)	28.7 (4.3)	ns
Tiempo de evolución (DE)	8.2 (8.5)	NA	-
DAS28 (DE)	4.60 (1.5)	NA	-
FR [U/ml]	628.5 (870)	NA	-
aPCC [U/ml]	111.7 (82)	NA	-
Leptina [ng/ml]	0.31 (0.1)	0.23 (0.05)	<0.05
Adiponectina [ng/ml]	159.1 (83)	90.07 (28)	<0.01
Resistina [ng/ml]	1.45 (0.73)	1.29 (0.48)	ns
TNF- α [ng/ml]	16.0 (0.6)	8.5 (0.7)	<0.05
IL-17 [pg/ml]	116 (43)	35.4 (20.3)	<0.01
IL-6 [ng/ml]	5.12 (0.10)	5.40 (0.11)	ns

DE Desviación estándar, IMC Índice de masa corporal, FR factor reumatoide, aPCC, antiPéptido citrunilado cíclico, DAS28, índice de actividad clínica, ns no existe significancia estadística.

Los pacientes que formaron parte de este estudio, fueron aquellos que voluntariamente aceptaron participar y a los cuales se les determinaron parámetros de peso, talla y glucosa.

Los pacientes con AR activa que recibían en el momento de captura de la muestra un tratamiento, este consistía en prednisona, cloroquina, mextotrexato y/o AINES, variables no consideradas en el análisis de este trabajo. Por su parte, los donadores fueron reclutados en el Banco de Sangre con el fin de favorecer que fuera población sana. Adicionalmente, los donadores fueron pareados con las poblaciones de pacientes en base al sexo (M/H), la edad y el IMC.

6.2 OPTIMIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE ELISA PARA DETERMINAR ADIPOCITOCINAS Y CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS.

En el presente estudio, fue de enorme importancia poder optimizar un sistema de determinación de los niveles de las citocinas específico y reproducible. Con este fin, como se describió en la metodología, se realizaron diferentes ensayos particulares para cada molécula con el fin de determinar las mejores condiciones de empleo de los anticuerpos específicos. Con este objetivo, se realizaron ensayos preliminares con cada juego de anticuerpos específicos para cada citocina, como se mostrará a continuación.

6.2.1 DILUCIÓN DE PLASMAS A EVALUAR.

Por otro lado, en la estandarización de los ensayos de ELISA tuvo que identificarse la dilución del plasma que permitiera obtener mejores resultados. Para ello, se realizaron ensayos de ELISA con diferentes diluciones partiendo de 1:1000 hasta 1:200,000 para los plasmas de un subgrupo de donadores y pacientes. En la Figura 11 se observan los cambios en el valor experimental al emplear diferentes diluciones del mismo plasma de donadores y pacientes. Finalmente, se eligió como la mejor dilución de trabajo para una molécula como la dilución anterior a observar una disminución en la densidad óptica por efecto de la dilución de la muestra. Esta regla nos podría sugerir que la concentración de la citocina se

encuentra en relación directamente proporcional con la dilución, sin tener un efecto importante sobre la sensibilidad del ensayo.

En la Figura 11 se muestra la curva de valores de leptina al emplear diferentes diluciones de plasma de donador o de paciente. Se puede observar que a partir de la dilución de 1:8,000 nos permite obtener lecturas sensibles a la dilución, tanto para el donador como para el paciente. Obsérvese que diluciones menores, no sólo no presentan valores mayores sino que no sigue una relación lineal con la dilución. Un perfil semejante se puede observar para la IL-17 (Figura 11E), donde se determinó que la mejor dilución es de 1:8,000.

En la Figura 11A se observa que a partir de la dilución 1:25,000 ó 1:30,000 los valores de D.O._{490nm} varían de acuerdo con su dilución. Es por eso que se eligió la dilución de 1:25,000 como la condición para evaluar los plasmas tanto de donadores como de pacientes. Por su parte, en la Figura 11C, la mejor dilución para evaluar la resistina fue 1:50,000, mientras las citocinas TNF α e IL-6 se evaluaron a una dilución de 1:6000 (Figuras 11 A, D y F, respectivamente). En la Tabla 5, se resumen las diluciones finales a las cuales se evaluaron las poblaciones de pacientes con AR y donadores. Conviene resaltar que sólo la adiponectina y la resistina requirieron una mayor dilución de los plasmas (1:25,000 y 1:50,000) que el resto de las moléculas a evaluar (entre 1:6,000 y 1:8,000), esta diferencia coincide con las determinaciones en la literatura donde estas adipocitocinas se encuentran en plasma humano en concentraciones bastantes mayores (hasta en el nivel de micromolar); mientras que varias citocinas se han determinado a nivel de picogramos-nanogramos.

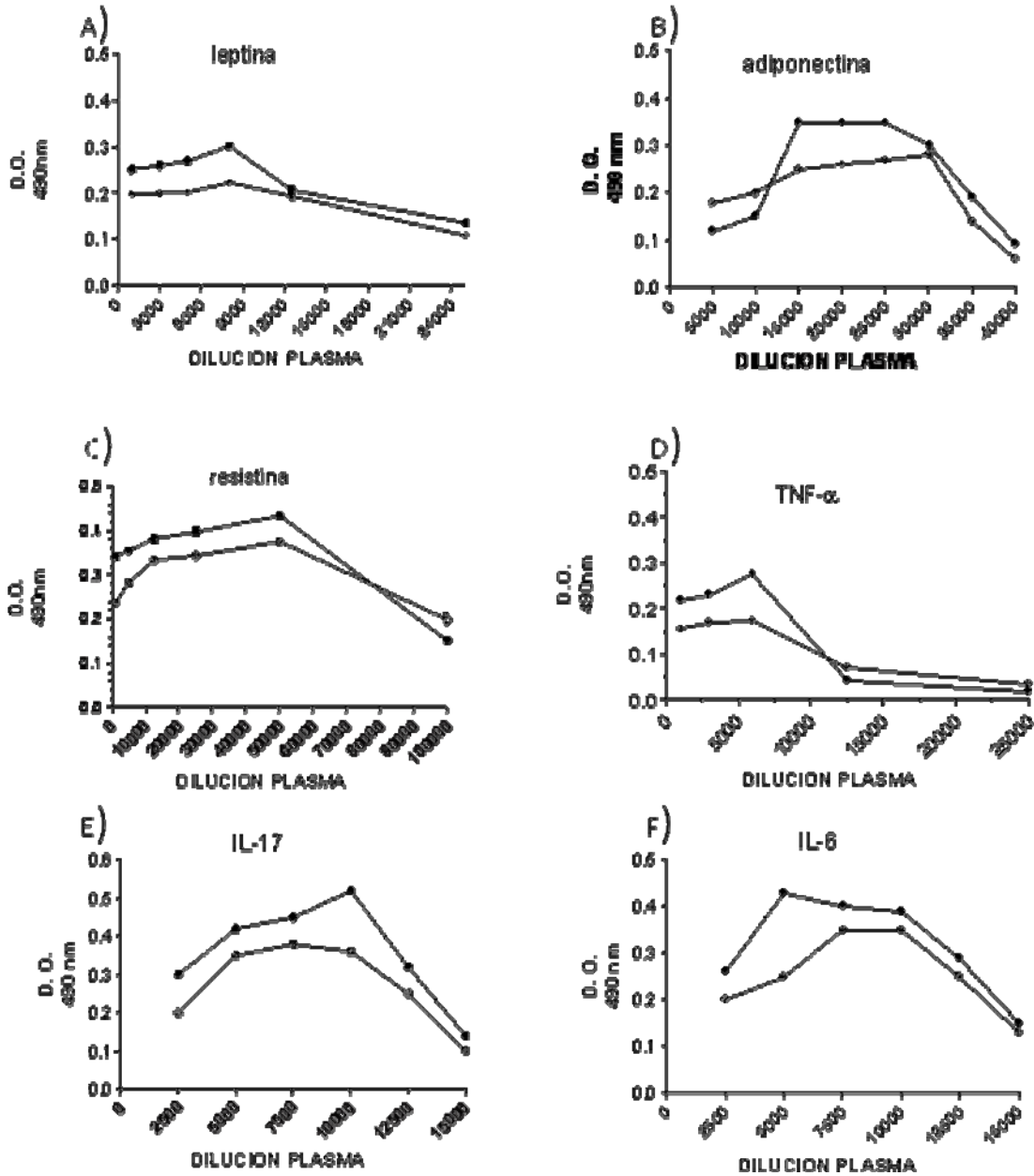


Figura 11.- Titulación de la dilución de plasma de donadores y pacientes. Los ensayos fueron realizados por triplicado, y en las condiciones descritas en el texto. Los círculos oscuros corresponden a los ensayos hechos con pacientes con AR, los círculos vacíos corresponden a donadores. A) Titulación de la dilución de plasma para la determinación de leptina; B) Titulación de la dilución de plasma para la determinación de adiponectina; C) Titulación de la dilución de plasma para la determinación de resistina; D) Titulación de la dilución de plasma para la determinación de TNF- α ; E) Titulación de la dilución de plasma para la determinación de IL-17; F) Titulación de la dilución de plasma para la determinación de IL-6.

6.2.2 OPTIMIZACIÓN DE DILUCIÓN DE ANTICUERPOS

Como se observa en la Figura 12, se realizaron diluciones seriadas de los anticuerpos primarios y secundarios para cada citocina, lo cual permitió determinar las mejores condiciones de empleo para evaluar las diferentes citocinas y adipocitocinas. Así entonces, en la Figura 12 se observa las titulaciones para los anticuerpos primarios y secundarios para leptina. En este caso se encontró que los niveles de densidad óptica más elevados se obtuvieron empleando una dilución de 1:800 del 1er anticuerpo, cuando se mantuvo constante el anticuerpo secundario (1:1,500). Por su parte, manteniendo el 1er anticuerpo constante (1:800) observamos que la mejor DO_{490nm} se obtuvo con la dilución 1:1,500 del anticuerpo secundario.

En el caso de las adipocitocinas adiponectina y resistina se encontró que las DO_{490nm} más elevadas se obtuvieron empleando una dilución de 1:1,000, tanto para el primer como para los anticuerpos secundarios (Figuras 12B y 12C).

Por otra parte, en la Figura 12D se observa la titulación del anticuerpo primario a dos diluciones del anticuerpo secundario (1:1000 y 1:1500) para TNF- α . En estos ensayos observamos que el valor más elevado de DO_{490m} se obtiene en la combinación 1:600 y 1:1,500 de anticuerpos primarios y secundarios, respectivamente. Algo semejante se realizó para las citocinas IL-6 (Figura 12E) e IL-17 (Figura 12F), dando por resultado que la mejor combinación de anticuerpos fueron: 1:600 y 1:1,000, para IL-6 y 1:1,500 y 1:1,000, para IL-17.

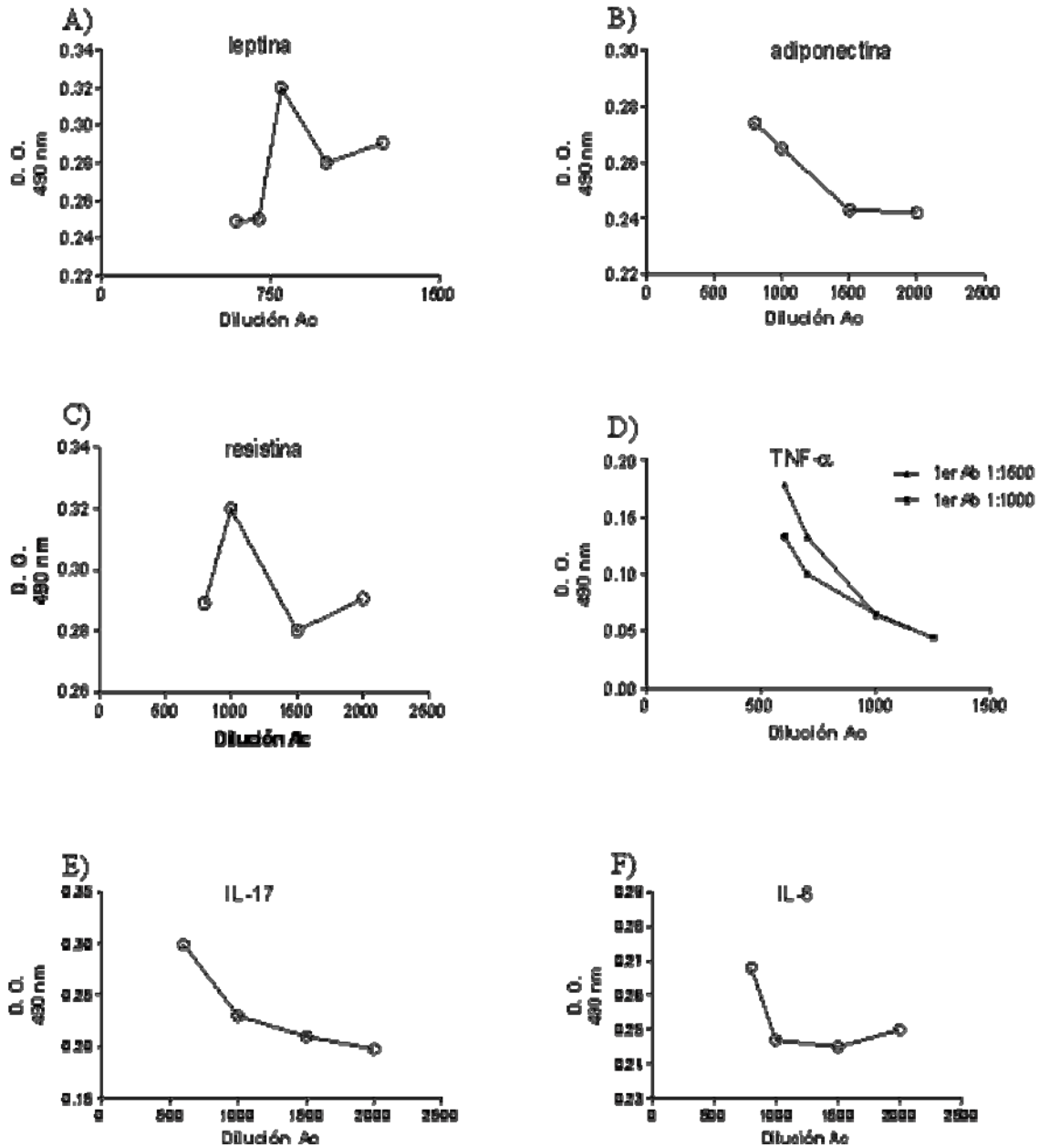


Figura 12.- Titulación de los anticuerpos primarios y secundarios. Ensayos realizados por triplicado, y donde se muestra la media correspondiente a cada dilución. A) Titulación de la dilución de anticuerpos para la determinación de leptina. B) Titulación de la dilución de anticuerpos para la determinación de Adiponectina. C) Titulación de la dilución de anticuerpo para la determinación de resistina. D) Titulación de la dilución de anticuerpos para la determinación de TNF α . E) Titulación de la dilución de anticuerpos para la determinación de IL-17. F) Titulación de la dilución de anticuerpos para la determinación de IL-6.

En la Tabla 5 se resumen los resultados obtenidos en la estandarización de la técnica de ELISA tanto para las adipocitocinas así como de las citocinas pro-inflamatorias de este estudio.

Tabla 5.- Cuadro integral de condiciones para determinación por ELISA de adipocitocinas y citocinas.

<i>CITOCINA</i>	<i>DILUCION SUERO</i>	<i>PRIMER ANTICUERPO</i>	<i>SEGUNDO ANTICUERPO</i>
LEPTINA	1:8,000	1:800	1:1,500(anticonejo)
ADIPONECTINA	1:25,000	1:1,000	1:1,000(anticabra)
RESISTINA	1:50,000	1:1000	1:1,000 (anticabra)
IL-17	1:8,000	1:800	1:800(anticonejo)
TNF α	1:6,000	1:600	1:1:1,000(antiratón)
IL-6	1:6,000	1:600	1:1,000(antiratón)

6.2.3 NIVELES DE LEPTINA EN PACIENTES CON AR

A) CURVA ESTÁNDAR

Para la determinación de la concentración plasmática de Leptina se realizó una curva patrón, para lo cual se empleó como estándar la proteína leptina recombinante humana (Sigma. Cat: 195807 Lot: 6424H 500 UG.). En la Figura 13 se observa la curva patrón representativa obtenida para leptina. La curva patrón presentó una pendiente de 0.01175, un valor de ordenada al origen de 0.0218 y un factor de correlación (r^2) de 0.98. La menor cantidad de leptina cuantificada (sensibilidad del sistema) fue de 0.10 ng. Posterior a la determinación de la DO_{490nm} para los plasmas de donadores y pacientes con AR, y en base al factor de dilución empleado para evaluar las muestras, se procedió a interpolar en esta curva estándar, para determinar las concentraciones en ng/ml. En sección se hizo la observación que en todas las placas de ELISA se verificaron incluyendo una curva patrón. El grado de confiabilidad de nuestra curva estándar, nos la proporcionó el factor de correlación (r^2) que en caso de la curva de leptina fue de 0.9834, sugiriendo que dentro de

los límites de este sistema tenemos un nivel alto de certidumbre para asociar la concentración de leptina en el plasma de donadores/pacientes con la concentración de la proteína recombinante.

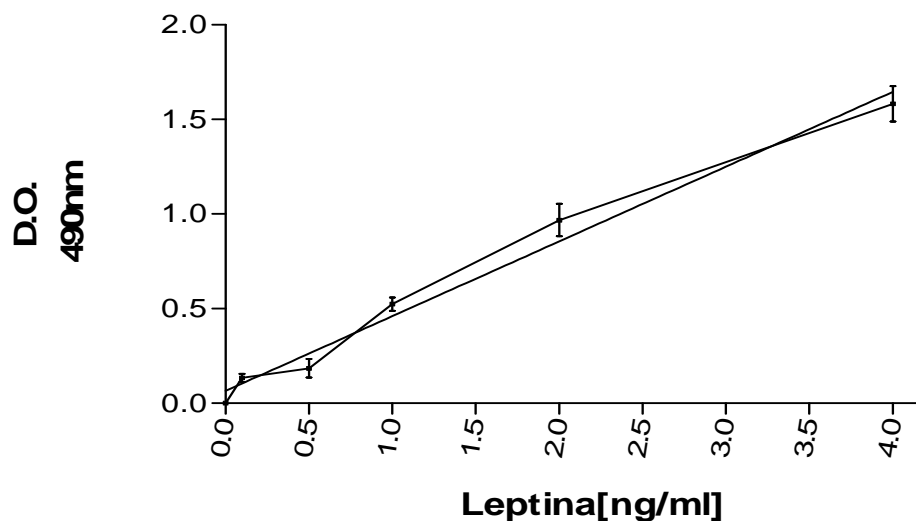


Figura 13.- Curva patrón para leptina. Se cuantificó la concentración de leptina por elaboración de una curva patrón a diferentes concentraciones y empleando leptina humana recombinante (Cat 195807, Lot #6424H, Sigma).

A) DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES EN DONADORES Y PACIENTES

En las condiciones de análisis descritas en la sección anterior, se procedió a evaluar los niveles de leptina de las dos poblaciones en estudio: donadores sanos (n=90) y pacientes con AR (n=131). En la Figura 14A y B podemos observar que los niveles de leptina en pacientes son mayores en donadores (0.3079 ± 0.009 ng/ml) con respecto a los niveles en donadores (0.2364 ± 0.005 ng/ml). Al evaluar esta diferencia por la prueba de t de Mann Whitney, obtuvimos una $p < 0.0001$, lo cual indica que la diferencia entre pacientes y donadores es significativa. Conviene resaltar que observamos un nivel de variación considerable entre los individuos. Particularmente en los pacientes con AR, donde podemos observar pacientes con niveles semejantes a los donadores, al tiempo que otros pacientes presentan niveles tres veces más altos al promedio de los donadores.

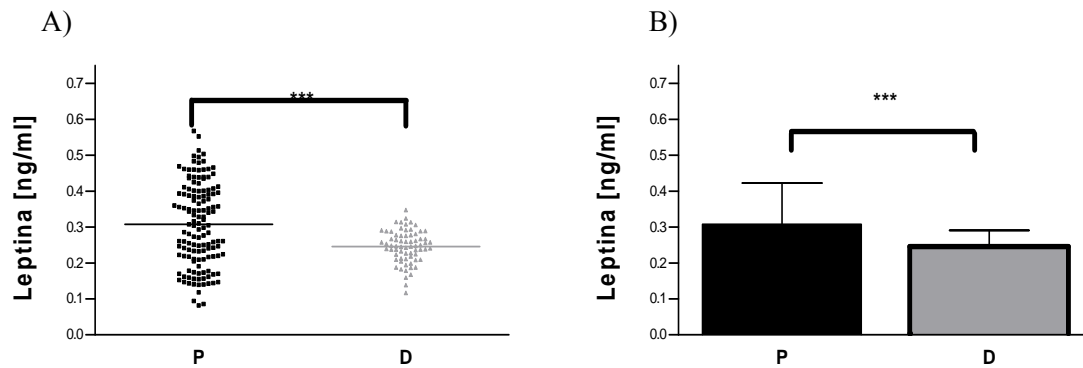


Figura 14.- Niveles de leptina en plasma encontrado entre pacientes con AR y donadores. A) Gráfica de puntos donde se muestran las evaluaciones de leptina. B) Gráfica de barras que muestra el promedio de las concentraciones de leptina, en sangre periférica de pacientes (P) n=131 y donadores (D) n=90 con la enfermedad, p: 0.0003 P respecto a D.

B) CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE LEPTINA Y ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD

Como se mencionó previamente, el grado de deterioro, evolución de la enfermedad o en este trabajo llamado actividad de la enfermedad se mide por medio del índice clínico DAS 28. Esta valoración involucra el conteo de las articulaciones inflamadas y dolorosas así como parámetros del laboratorio (VSG, FR o aPCC) y valoraciones del médico tratante. Considerando que observamos que los niveles de leptina fueron superiores en los pacientes, quisimos evaluar si las diferencias entre pacientes pudieran estar relacionadas con las diferencias en la actividad de la enfermedad (DAS28). En este sentido, en la Figura 15 se relacionan estos dos parámetros y se puede apreciar una ligera tendencia a mostrar una relación directamente proporcional entre la leptina y la actividad: los pacientes con AR que mostraron una mayor actividad fueron pacientes que presentaron niveles mayores de leptina. Al realizar un análisis de correlación por la técnica no-paramétrica (Spearman) nos dio una $\rho = 0.228$ y una $p = 0.0146$. Estos resultados sugieren la existencia de una correlación, ligera, pero estadísticamente significativa entre la actividad clínica y los niveles de leptina.

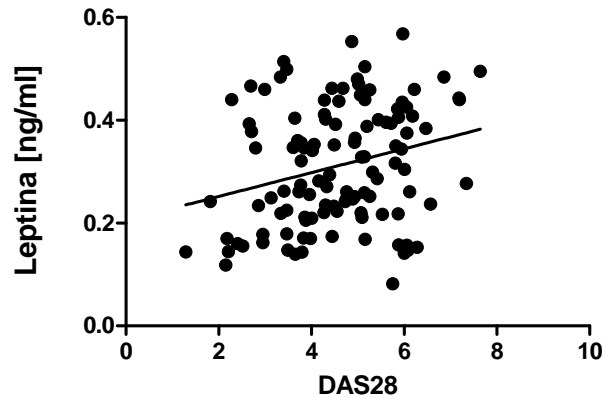


Figura 15.- Relación entre el nivel de leptina plasmática y el grado de actividad. Se observa una regresión lineal entre todos los valores experimentales, con una r^2 de 0.7719. Adicionalmente, se obtuvo una rho de Spearman de 0.228, $p= 0.0146$ lo cual sugiere una correlación significativa entre actividad y niveles de leptina.

Para definir que un paciente presenta AR activa en el presente estudio se consideró un umbral de 2.6 en la escala de DAS28 (menor a 2.6 fue considerado como no-activo y mayor de 2.6 representa a un proceso activo), nivel que coincide con varios otros trabajos en el área de la reumatología (Welsing et al, 2001). Debido a que la población de pacientes que estudiamos presentaba amplia heterogeneidad, decidimos re-analizar la relación de leptina y actividad separando los pacientes en base a su evaluación clínica: A) pacientes no-activos (<2.6 , $n=8$), B) pacientes con actividad media ($2.6 - 5.0$, $n=76$) y, C) pacientes con alta actividad (>5.0 , $n=60$). Como podemos observar en la Figura 15, los niveles de leptina parecen incrementar con el nivel de actividad, siendo los pacientes con mayor actividad aquellos que presentan los más altos niveles de leptina (Promedio \pm desviación Estándar).

Asimismo, en comparación con los pacientes sin actividad (promedio \pm desviación estándar), los pacientes con actividad media fueron significativamente diferentes. De esto se puede sugerir que el nivel de actividad de la AR parece estar relacionar con los niveles de leptina plasmática en los pacientes.

Con el objetivo de confirmar estadísticamente la presencia de una correlación, cada uno de estos grupos de pacientes se analizó de manera separada por la prueba correlación de Spearman (datos no mostrados). En estas condiciones, se observó que los pacientes con AR severa presentaron una $\rho= 0.658$, los pacientes con AR media una $\rho=0.355$ y los pacientes con AR inactiva con $\rho=0.302$. Indicándonos que los pacientes con AR severa

presentan una mayor asociación entre la actividad y los niveles de leptina, que los otros grupos de pacientes. Esto podría sugerir que el nivel de leptina sería un biomarcador para confirmar el grado de la actividad en los pacientes con AR severa, sin embargo en pacientes con AR no-severa su capacidad como biomarcador sería parcial.

Estos resultados podrían sugerir que el incremento de leptina se presenta como consecuencia de la inflamación crónica en los pacientes con AR. Al mismo tiempo, la asociación de la leptina con niveles altos de actividad podría sugerir que participa en la severidad de la enfermedad y/o con el nivel de respuesta a tratamiento terapéutico por parte de los pacientes.

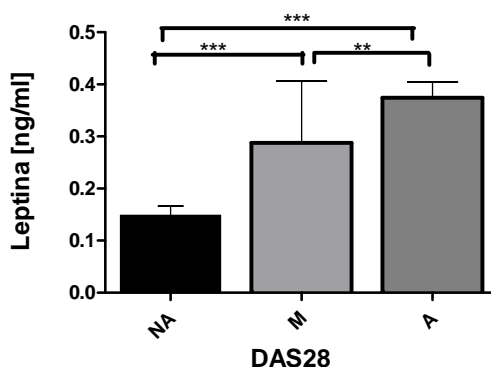


Figura 16.- Comparación entre los niveles de leptina en las subpoblaciones de pacientes divididos por su actividad (DAS28). Se muestra el promedio de las concentraciones de leptina de los grupos de pacientes con AR, los cuales se estratificaron en base a su nivel de actividad clínica: no activos (NA), actividad media (M) y actividad alta (A). La barra de error representa la desviación estándar y se indica las diferencias significativas entre grupos (prueba de Mann Whitney) grupo M respecto a NA p: 0.0003, grupo A respecto a NA p: 0.0006, grupo A respecto a M p: 0.0078. El grupo NA tuvo una n=8, el grupo M tuvo una n=76 y el grupo A tuvo una n=60.

C) CORRELACIÓN DE LEPTINA Y EL TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

Así mismo, evaluamos la posible correlación entre el tiempo de evolución de los Pacientes y los niveles plasmáticos de leptina (Figura 17). Como se puede observar, los niveles de leptina varían sin importar cuánto tiempo (años) tengan desde que iniciaron los síntomas (Figura 17A). Al evaluar por la prueba de Spearman obtuvimos una rho de 0.102 y una p=0.5837, por lo que podemos decir que no hay asociación estadística entre el tiempo de evolución y los niveles de leptina.

Cuando estratificamos los pacientes en base al tiempo de evolución (T, temprano < 1 año; M, medio 1-15 años; y L, larga evolución, >15 años), y los comparamos en su nivel de leptina observamos que no hay diferencia significativa entre pacientes tempranos, medio y larga evolución.

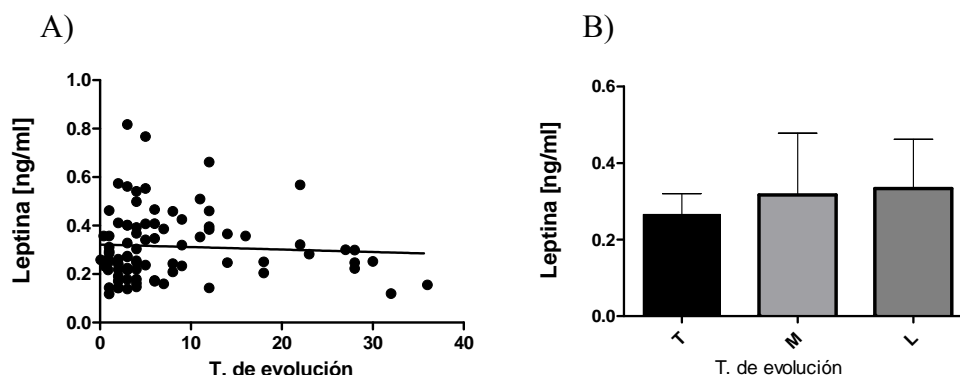


Figura 17.- Relación entre el tiempo de evolución, los niveles de leptina y la estratificación
 A) Correlación entre el tiempo de evolución del total de la Población de Pacientes y los niveles de Leptina r: 0.1020, p: 0.3527. B) Estratificación de los diferentes tiempos de evolución de los pacientes y los niveles de Leptina p: 0.6352 (1 one way Anova) .T pacientes con menos de un año con la enfermedad n= 11, M pacientes entre 1 y 20 años n=65 y L pacientes con más de 20 años con la enfermedad n=55.

D) CORRELACIÓN DE LEPTINA Y EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC)

Como se mencionó anteriormente (Poblaciones de estudio), fueron estadísticamente semejantes los índices de masa corporal (IMC) de donadores y pacientes con AR (28.74 vs. 27.65kg/cm²), como se puede observar en la Figura 18. Así se puede observar que a pesar de tener una IMC semejante, los niveles de leptina en pacientes son comparativamente mayores, esto podría sugerir que el aumento de esta adipocitocina está relacionada más bien con la inflamación crónica que con la acumulación de grasa. Conviene recordar que varios estudios han observado que los niveles de leptina se incrementan en relación directa con el IMC y con la acumulación de grasa. Como se puede observar, algunos donadores evaluados presentaron niveles cercanos a 40 de IMC y, sin embargo, nunca rebasaron 0.4 ng/ml de leptina en sangre periférica, mientras que varios pacientes mostraron niveles superiores.

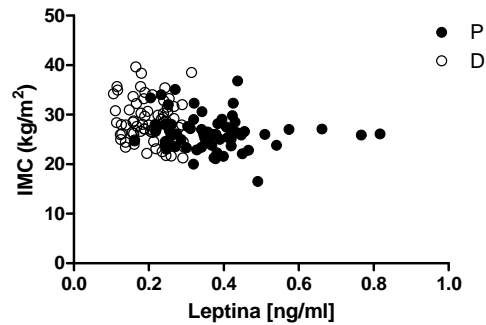


Figura 18.- Relación entre el nivel de leptina plasmática y el IMC en donadores y pacientes con AR. Los círculos llenos corresponden a los pacientes (P) n=131 y los círculos vacíos corresponden a los donadores (D) n=90.

Al evaluar por la prueba de Spearman (datos no mostrados) se confirmó que no existe correlación significativa entre el IMC y los niveles de leptina, lo cual sugiere que el incremento de leptina no obedece a la acumulación de adipocitos, sino más bien como respuesta a la actividad inflamatoria.

E) RELACIÓN DE LEPTINA Y AUTOANTICUERPOS

Los niveles del factor reumatoide (FR) constituyen un parámetro clínico utilizado rutinariamente para el diagnóstico y seguimiento de la AR, aunque no presenta alta especificidad. En el presente estudio, sin embargo se determinaron los niveles del FR a todos los pacientes incluidos en el protocolo, para evaluar su posible relación con la enfermedad. En la Figura 19 se observa la relación entre los niveles de leptina plasmática y el FR. Cuando se considera el total de pacientes se obtiene una rho de Spearman de 0.338 con una $p < 0.0001$, sugiriendo una ligera correlación estadística. Cuando se detalla el análisis sólo para los pacientes con niveles de FR mayores a 1000 (A), se obtuvo una rho= 0.5387y una $p= 0.0004$, que estadísticamente es significativo, es decir la disparidad de los dos grupos en estudio es significativamente diferente.

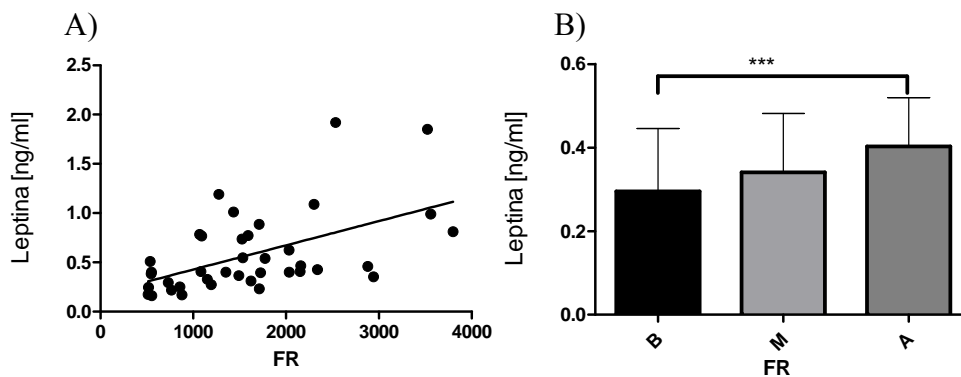


Figura 19.- Relación entre el nivel de leptina plasmática y el FR entre pacientes con AR

A) Correlación entre el tiempo de evolución de la población de pacientes con niveles altos de RF y los niveles de Leptina $\rho = 0.5387$ y una $p = 0.0004$ B) Estratificación de los diferentes valores de RF de los pacientes y los niveles de Leptina, (B) valor de FR menor a 500 U/ml $n = 69$, (M) valor de RF entre 500 y 1000 U/ml $n = 25$, (A) valores de FR mayores a 1000 U/ml $n = 28$, $p = 0.0005$ para A respecto a B.

El factor reumatoide es un parámetro clínico de la enfermedad, utilizado rutinariamente para el diagnóstico y seguimiento de la AR. Debido a su baja especificidad, durante los últimos años se han buscado y desarrollado nuevos parámetros para su diagnóstico precoz siendo el más relevante los anticuerpos anti péptidos citrulinados cíclicos; por esto se midió y realizó el análisis de correlación entre este y la cantidad de proteína.

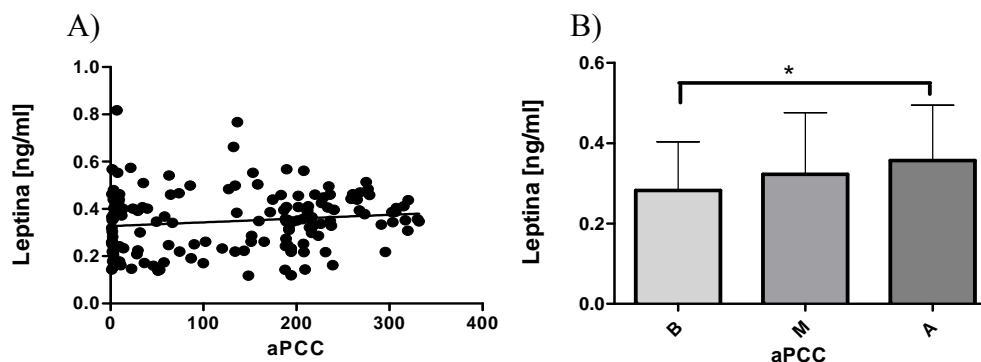


Figura 20.- Relación entre el nivel de leptina plasmática y aPCC en pacientes con AR

A) Correlación entre el tiempo de evolución del total de la población de pacientes y los niveles de leptina $\rho = 0.1649$, $p = 0.0445$. B) Estratificación de los niveles de aPCC de los pacientes y los niveles de Leptina, (B) niveles de aPCC entre 1 y 50U/m, $n = 39$, (M) valores entre 50 y 200 U/ml, $n = 59$, (A) valores mayores a 200 U/ml $n = 33$, $p = 0.0349$ entre grupo A y B.

La correlación de este parámetro fue positiva es decir se obtuvo una $\rho = 0.1649$ de Spearman y $p = 0.0445$ que estadísticamente es significativo (ver Figura 20A). Este dato se

confirmó al realizar una estratificación resultando la correlación estadísticamente significativa entre el menor a 200 (B) y aPCC mayor a 1200 (A), respecto a los niveles de leptina, $p: 0.0349$. (ver Figura 20B)

F) RELACIÓN CON CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS

La AR como ya se describió previamente es una enfermedad de inflamación sistémica por tanto, es importante realizar un análisis estadístico en el cual se involucre las adipocitocinas con patrones de inflamación como lo son citocinas pro-inflamatorias. En nuestro estudio se llevo a cabo el estudio de tres citocinas que participan en la inflamación como lo son $TNF\alpha$, IL-6 e IL-17.

En el análisis de correlación observamos que $TNF\alpha$ no correlaciona con Leptina aunque observamos una tendencia, es decir a mayor nivel de $TNF\alpha$ mayor leptina, observación que no se encontró con IL-6. El análisis estadístico nos dice que no hay tendencia que involucre a IL-6.

Contrario a lo anterior, la citocina IL-17 correlaciona de manera significativa con leptina (prueba de Spearman $\rho: 0.1751$, $p: 0.0339$).

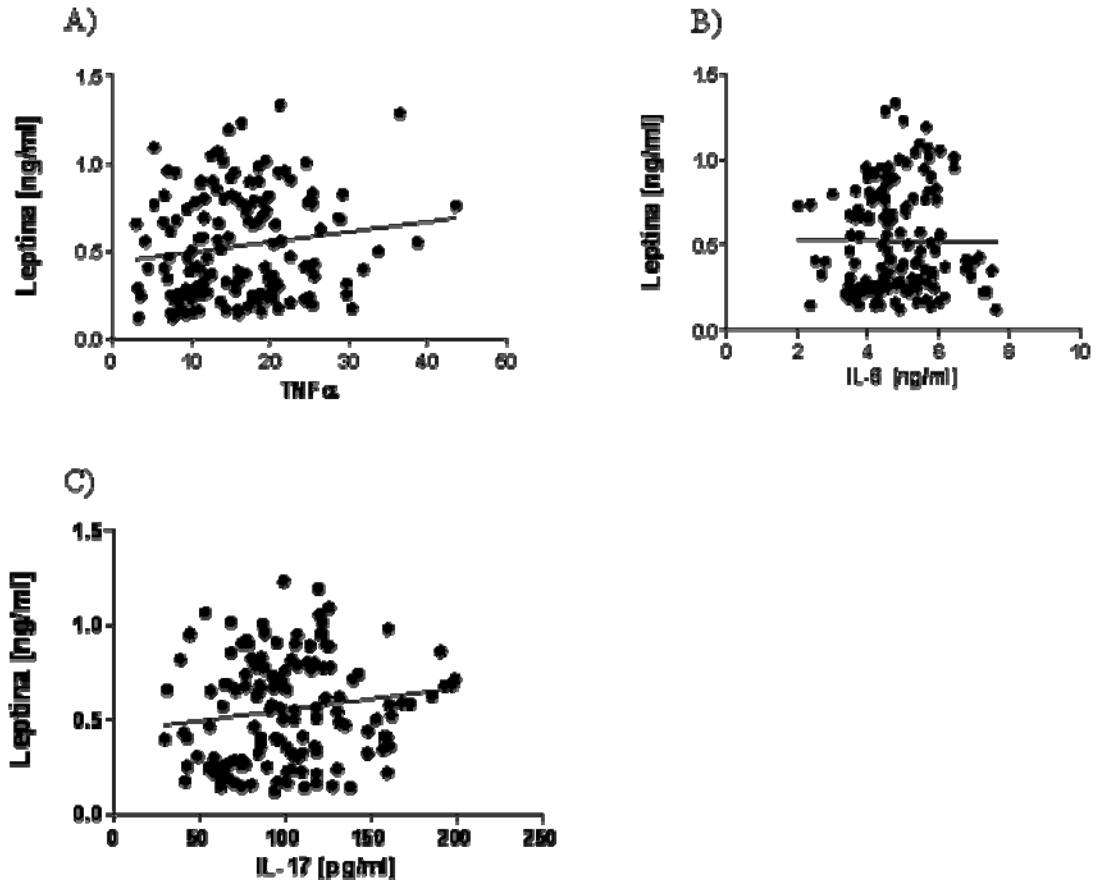


Figura 21: Correlación de adipocitocinas y citocinas inflamatorias en pacientes AR.

A) Correlación entre leptina y TNF α rho: 0.1515, p: 0.0634 B) Correlación entre Leptina e IL-6 rho: 0.04719, p: 0.5716 C). Correlación significativa entre leptina e IL-17 rho: 0.1751, p: 0.0339, n=131.

6.2.4 NIVELES DE ADIPONECTINA EN PACIENTES CON AR

A) CURVA PATRÓN

Para la determinación de los niveles de adiponectina se estandarizó una curva patrón, de acuerdo a las condiciones descritas en la Tabla 5 (sección 6.2.2 de resultados). Para esta curva patrón se empleó la proteína adiponectina recombinante humana (PeproTech. No: Cat.450-24. Lot# 1107331k2007). Como se observa en la Figura 22, existe una relación lineal entre la DO_{490nm} y la concentración de adiponectina en el intervalo de 10 y 100 ng/ml. Asimismo, esta relación presentó una pendiente de 0.0454, un valor de ordenada al origen de 0.0899 y un factor de correlación (r^2) de 0.98. En base a los anteriores parámetros y considerando el factor de dilución de la muestra a evaluar, se pudo obtener las concentraciones, en unidades de ng/ml para adiponectina. Se realizó la curva patrón en cada experimento realizado, sirviendo como control positivo de la técnica, así como referencia de comparación interensayo.

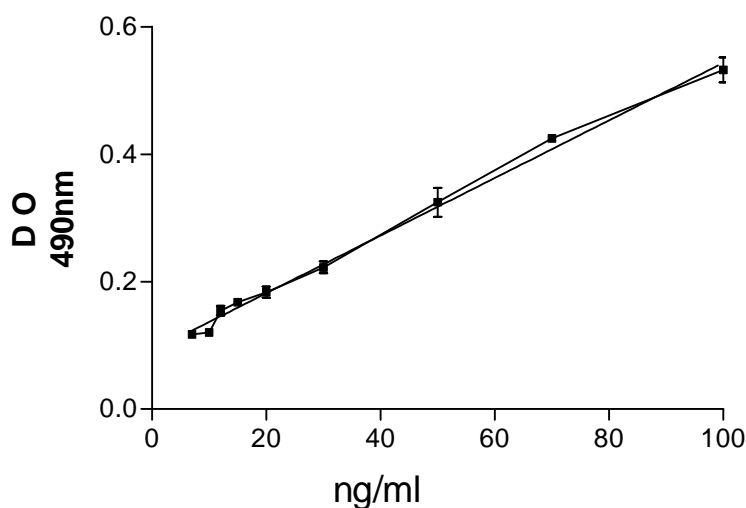


Figura 22.- Curva patrón para Adiponectina. Se cuantificó la concentración de adiponectina por medio de una curva patrón a diferentes concentraciones empleando adiponectina humana recombinante (ver texto). Los resultados corresponden al promedio \pm desviación estándar de 3 ensayos independientes

B) DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES EN DONADORES Y PACIENTES

En el presente estudio, los niveles de la adiponectina fueron más elevados en pacientes con AR con respecto a los donadores sanos: pacientes 159.1 ± 8.8 ng/ml y donadores 90.07 ± 2.8 ng/ml (ver Figura 23). Al evaluar por la prueba de Mann-Whitney obtuvimos una p de 0.001, lo cual indica que la diferencia entre los niveles de pacientes con AR y donadores sanos fue estadísticamente significativa. En la Figura 23 se observa que su determinación muestra un alto grado de variación en los pacientes (entre 50 y 300 ng/ml), a diferencia de lo que observamos en los donadores, donde los niveles fueron similares.

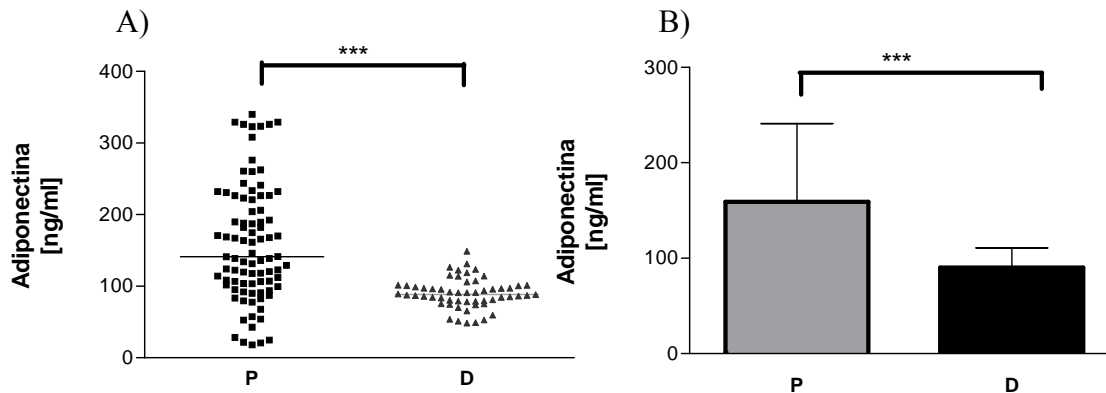


Figura 23.- Niveles de Adiponectina en plasma de pacientes con AR y donadores. A) Gráfica de puntos donde se muestran los niveles detectados entre donadores (D) y pacientes (P). B) Gráfica de barras que muestra el promedio de las concentraciones de adiponectina, en sangre periférica de pacientes (P) y donadores (D) con la enfermedad. Mann whitney $p > 0.001$ P respecto a D.

C) CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE ADIPONECTINA Y ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD.

Al evaluar la posible correlación entre la actividad clínica de la enfermedad de los pacientes y los niveles plasmáticos de adiponectina, como se observa en la Figura 24, no se encontró una correlación significativa. Al realizar una prueba de correlación de Spearman obtuvimos una rho de 0.097 y una $p: 0.2440$. Se puede concluir que la variación en los niveles de adiponectina entre los pacientes con AR que aquí evaluamos parece no asociarse directamente con un cambio en el índice clínico de la enfermedad.

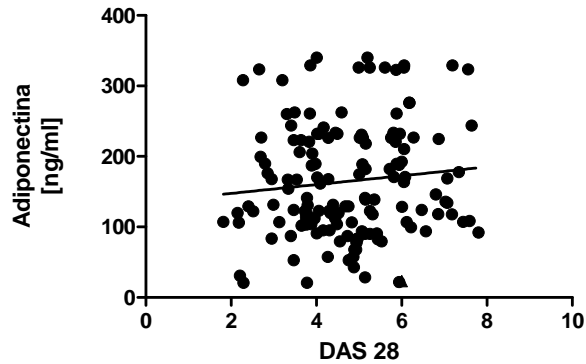


Figura 24.- Relación entre el nivel de Adiponectina plasmática y el grado de actividad. Cada punto corresponde a cada paciente incluido en el presente estudio. El análisis de correlación Spearman dio una rho de 0.097 y p de 0.2440. La regresión lineal permite observar que la variación de la adiponectina es independiente al índice de actividad n=131.

Debido a la heterogeneidad de la población de pacientes, re-evaluamos nuestros resultados en subgrupos de pacientes, diferenciados en base a su nivel de actividad. Se dividieron los pacientes a semejanza del análisis con leptina (NA-no activo [0-2.6], B-bajo [2.7-4.9] y A-alto [5.0-]). En la Figura 25 se observa que al comparar los niveles de adiponectina entre estos subgrupos de pacientes encontramos una diferencia significativa. Mientras que los pacientes no-activos y con actividad baja presentaron niveles semejantes de adiponectina (promedio \pm desviación de c/grupo) el grupo de pacientes con alta actividad (DAS28>5.0) presentó un nivel significativamente mayor de adiponectina (promedio \pm desviación estándar), con respecto a los pacientes no-activos (p=0.007). Esto sugiere que los niveles de adiponectina resultan de eventos posiblemente inflamatorios característicos de los pacientes con mayor actividad. Sin embargo cuando se re-evaluó la correlación de Spearman entre los niveles de adiponectina y la actividad sólo en este subgrupo de pacientes, no observamos una asociación significativa.

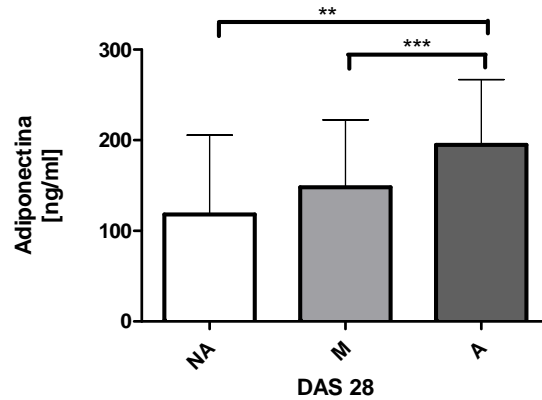


Figura 25.- Comparación de los niveles de adiponectina plasmática entre los subgrupos de actividad para los pacientes con AR. NA, corresponde a la enfermedad no activa (DAS28<2.6) n=8; M corresponde al nivel de actividad bajo (2.6-5.0) n=76; A, corresponde al nivel de actividad alto (DAS28>5.0) n= 60. Se muestra la desviación estándar correspondiente para cada grupo. Entre grupo NA y M p: 0.2519 no significativa, entre NA y A, p: 0.0077, entre M y A, p: 0.0003, valores significativos.

D) CORRELACIÓN DE ADIPONECTINA Y EL TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

Al evaluar la posible relación entre el tiempo de evolución de los pacientes y los niveles plasmáticos de la adipocitocina por la prueba de correlación de Spearman, resultó en valores no significativos ($\rho = -0.015$ y $p = 0.8536$) como se observa en la Figura 26. Ahora al estratificar la población de pacientes en base a su tiempo de evolución (T, temprano <1 año; M, medio 1-15 años; y L, larga evolución, >15 años), nos permitió observar que el grupo de pacientes con AR tardía presentó niveles aunque no significativamente inferiores a los otros dos grupos (Mann-Whitey 0.1086). Cuando se re-evaluó la relación entre los niveles de adiponectina y el tiempo de actividad, sólo en el grupo de pacientes tardíos (resultados no mostrados) se obtuvieron valores de asociación negativa.

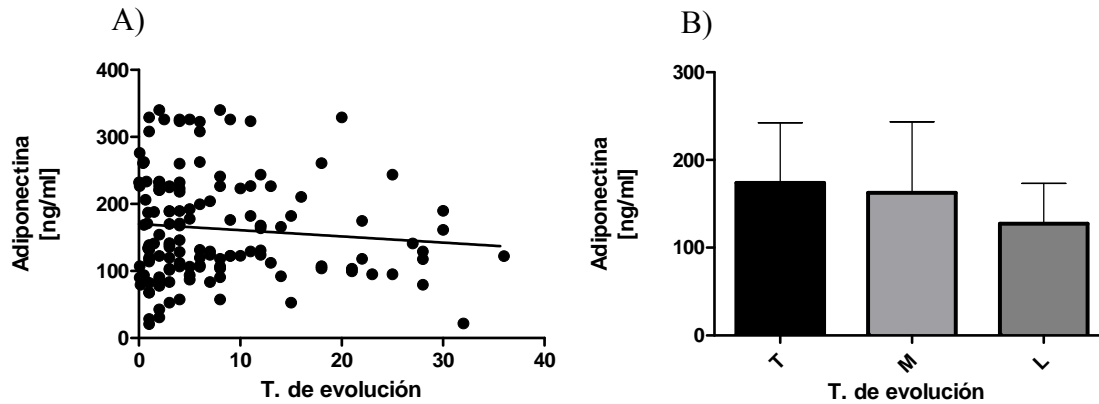


Figura 26.- Relación entre el tiempo de evolución y los niveles de adiponectina. A) Correlación entre el tiempo de evolución del total de la Población de Pacientes y los niveles de Adiponectina $r: -0.015680$, B) Estratificación de los pacientes en base a los tiempos de evolución (T, temprano $n=11$, M, mediana $n=65$ y L, larga evolución $n=55$). Al analizar por la prueba de Mann-Whitney y one way Anova no se obtuvo una diferencia significativa entre el grupo T y L ($p: 0.1086$).

E) CORRELACIÓN DE ADIPONECTINA Y EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC)

Al evaluar la relación entre el índice de masa corporal (IMC) y los niveles de adiponectina en pacientes no obtuvimos una correlación significativa (rho de Spearman de y $p: 0.3071$, datos no mostrados). Sin embargo, resulta relevante destacar que los niveles promedio del IMC entre donadores sanos y pacientes con AR fue similar ($28.74 \pm$ desviación y $27.65 \pm$ desviación, ver Tabla 5 y Figura 27). Como podemos observar en la Figura 27, a pesar de tener un IMC igual entre las dos poblaciones, los niveles de Adiponectina fueron significativamente superiores en los pacientes con AR. A semejanza de lo observado con la adipocitocina leptina, este aumento en los niveles de leptina no puede explicarse por una variación en el IMC. En cambio, se podría sugerir que resulta como consecuencia del proceso inflamatorio sistémico de los pacientes.

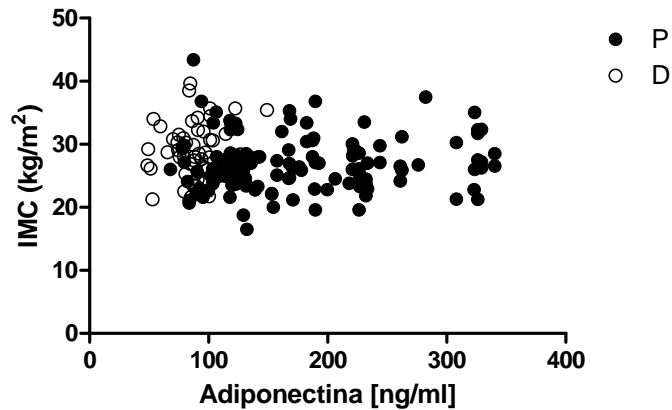


Figura 27.- Comparación entre el nivel de adiponectina plasmática de las dos poblaciones en estudio y el IMC. Los círculos llenos corresponden a los pacientes (P) y los círculos vacíos corresponden a los donadores (D). Se presenta el valor promedio de 3 evaluaciones independientes para cada muestra sanguínea tanto de donadores como de pacientes n= 131.

F) CORRELACIÓN DE ADIPONECTINA Y AUTOANTICUERPOS.

Por su parte, al evaluar la posible relación entre los niveles de los autoanticuerpos FR y aPCC observamos resultados diferentes. Por un lado, como podemos observar en la Figura 28A, obtuvimos una correlación de Spearman significativa entre los niveles de FR (U/ml) y los niveles de adiponectina ($\rho=0.29$ y $p=0.0002$). Adicionalmente, al estratificar la población de pacientes en base a los niveles del FR (B, bajo [FR<500], M, medio [500-1000] y A, alto [>1000] U/ml) pudimos observar una diferencia significativa entre los grupos B-A, $p: 0.0009$ y B-M, $p: 0.0112$ sugiriendo que el subgrupo de pacientes con niveles altos de FR presentaron niveles significativamente mayores de adiponectina con respecto al grupo B (Figura 28B). En base a estos resultados, se re-evaluó la correlación entre adiponectina y los niveles de FR sólo para el grupo con niveles altos de FR. Como se puede observar en la Figura 28C, se obtuvo una rho de Spearman superior siendo de 0.5 con una $p= 0.0216$; esto permitiría sugerir la existencia de una asociación estadística entre los niveles de adiponectina y FR sobretudo en los pacientes con niveles elevados de FR.

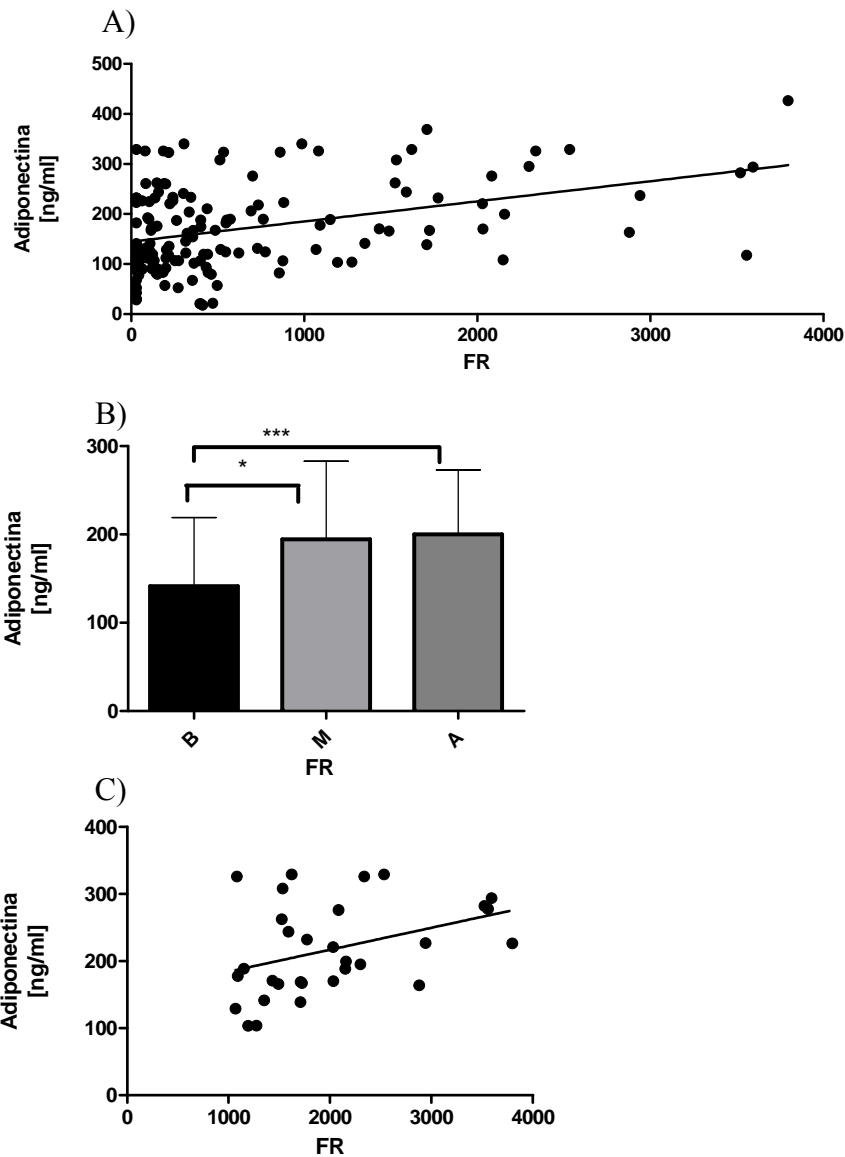


Figura 28.- Relación entre el nivel de adiponectina plasmática y el FR entre pacientes con AR
 A) Correlación entre el tiempo de evolución del total de la población de pacientes y los niveles de adiponectina rho: 0.2968, p:0.0002 n=131. B) Estratificación de los diferentes valores de RF de los pacientes [(B) valor de FR menor a 500 U/ml n=69, (M) valor de RF entre 500 y 1000 U/ml, n=25, (A) valores de FR mayores a 1000 U/ml n= 28] y los niveles de adiponectina entre los grupos B-A, p:0.0009 y B-M, p: 0.0112. C) Correlación de Spearman entre adiponectina y FR, para el subgrupo de pacientes con niveles altos (>1000 U/ml) de FR rho0.4110, p: 0.0216, n=28.

Al relacionar los niveles de esta adipocitocina y los niveles de aPCC, obtuvimos una rho de 0.134 y una p= 0.1068, sugiriendo que no hay correlación, como podemos observar en la Figura 29A. Al estratificar los pacientes en base a los niveles de aPCC, no pudimos observar diferencias significativas en relación a los niveles de adiponectina (Mann Whitney p= 0.2319, Figura 29B). De estos resultados podemos concluir que los niveles de adiponectina no se asocian con los cambios en el nivel del autoanticuerpo aPCC.

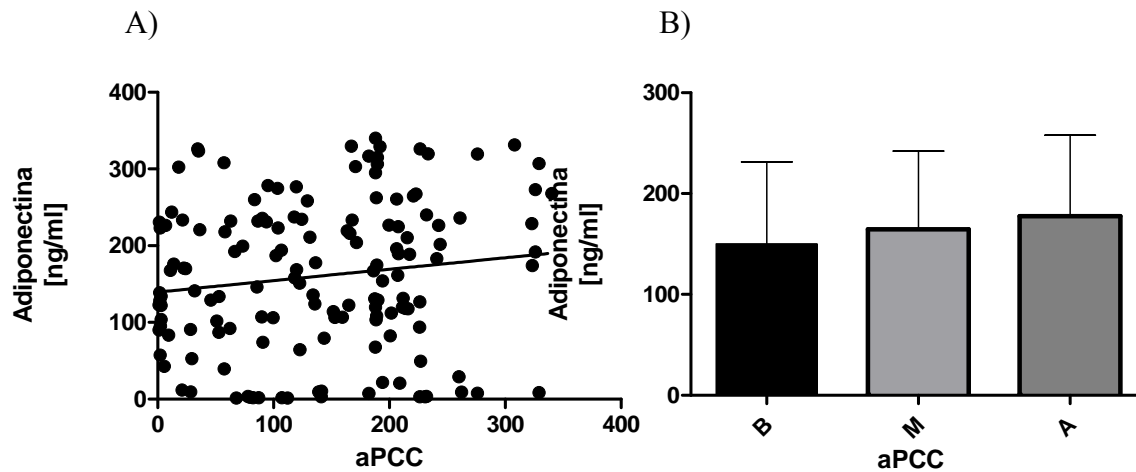


Figura 29.- Relación entre el nivel de adiponectina plasmática y entre aPCC pacientes con AR. A) Correlación entre el tiempo de evolución del total de la población de pacientes y los niveles de adiponectina rho: 0.134, p: 0.1068, n=131. B) Estratificación de los niveles de aPCC de los pacientes y los niveles de adiponectina (B) niveles de aPCC entre 1 y 50U/m, n=39, (M) valores entre 50 y 200 U/ml, n= 59, (A) valores mayores a 200 U/ml n= 33, p: 0.2319 (One way Anova).

G) RELACIÓN CON CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS

En este estudio se llevo a cabo el análisis de tres citocinas que participan en la inflamación como lo son $\text{TNF}\alpha$ IL-6 e IL-17. Se encontró una tendencia, en el análisis de correlación entre IL-6 y adiponectina es decir a mayores niveles de IL-6 mayores niveles de adiponectina, observación que no encontramos con IL-17. El análisis estadístico nos dice que no encontramos alguna relación que involucre a IL-6 con leptina así como tampoco observamos tendencia alguna de asociación.

Más sin embargo, la citocina $\text{TNF}\alpha$ sí correlaciona de manera significativa con los niveles de adiponectina, prueba de Spearman rho: 0.2148 p: 0.0085.

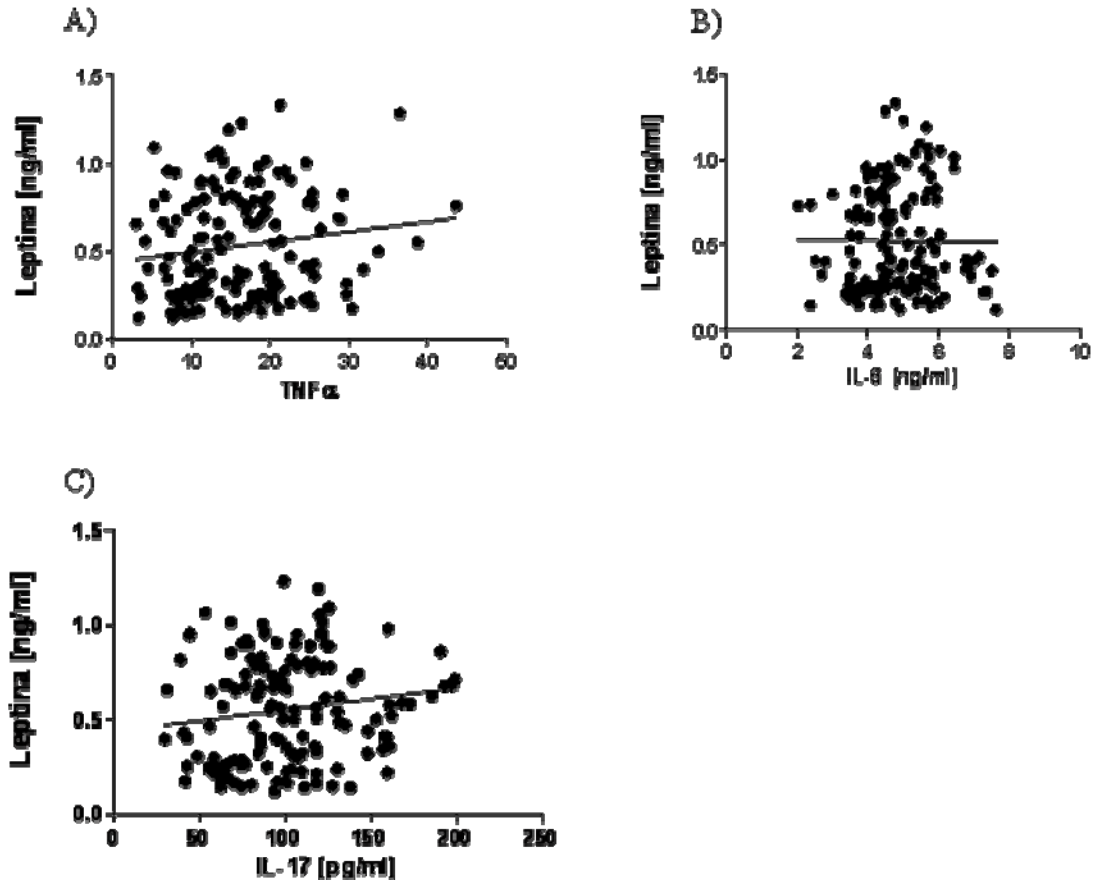


Figura 30: Correlación de adipocitocinas y citocinas inflamatorias en pacientes AR .

A) Correlación significativa entre adiponectina y TNF α rho: 0.2148 p: 0.0085 B) Correlación entre adiponectina e IL-6 rho: 0.1035 , p: 0.2172 C) Correlación significativa entre adiponectina e IL-17 rho: 0.02183, p: 0.7930, n=131.

6.2.5 NIVELES DE RESISTINA EN PACIENTES CON AR

A) CURVA PATRÓN

A semejanza de las otras adipocitocinas, la resistina fue cuantificada por interpolación en una curva patrón estandarizada, en la cual se empleó la proteína resistina recombinante humana (PeproTech. Cat.# 450-19, Lot# 0604235 D3007). Se puede observar en la Figura 31, una relación lineal entre 0.5 y 10 ng/ml de resistina, con una pendiente de 0.2202, un valor de ordenada al origen de 0.099 y un factor de correlación de 0.98. En base a estos parámetros, y considerando el factor de dilución de la muestra, se obtuvieron las concentraciones, en ng/ml, para resistina. En la Figura 31 podemos observar que el nivel de reproducibilidad fue muy alto, debido a que la desviación estándar promedio para 3 ensayos independientes fue menor al 5%. Adicionalmente, como con las otras adipocitocinas en cada ensayo de ELISA se realizó una curva patrón; permitiendo al mismo tiempo servir como control positivo de la técnica y como referencia para comparar entre ensayos.

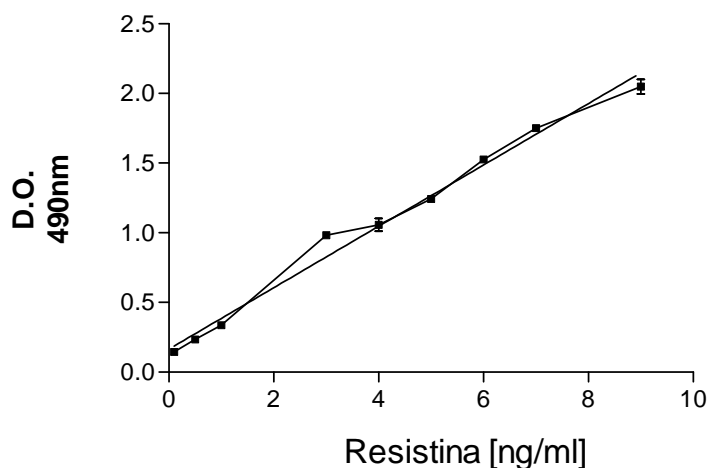


Figura 31. Curva patrón para resistina. Se cuantificó la concentración de resistina por elaboración de una curva patrón a diferentes concentraciones y empleando resistina humana recombinante. Los valores obtenidos son $m: 0.2202$, un valor de ordenada al origen de 0.099 y un factor de correlación de 0.98 , $n=6$.

B) DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES EN DONADORES Y PACIENTES

Al comparar los niveles de resistina entre los donadores sanos y los pacientes con AR observamos (Figura 32A y B) que estos últimos presentaron un nivel ligeramente superior a los donadores (pacientes 1.45 ± 0.07 y donadores 1.29 ± 0.05 ng/ml); sin embargo, esta diferencia resultó no significativa al analizar por la prueba de Mann Whitney, $p=0.9314$. Esto sugiere que no hay una diferencia en los niveles de resistina entre los pacientes con AR y los donadores. Como podemos observar en la Figura 32A, el intervalo de variación en la población de pacientes es muy grande, resultando en pacientes con niveles inferiores a los donadores sanos (<1 ng/ml) al tiempo de observar individuos con niveles 2 veces mayores que los donadores.

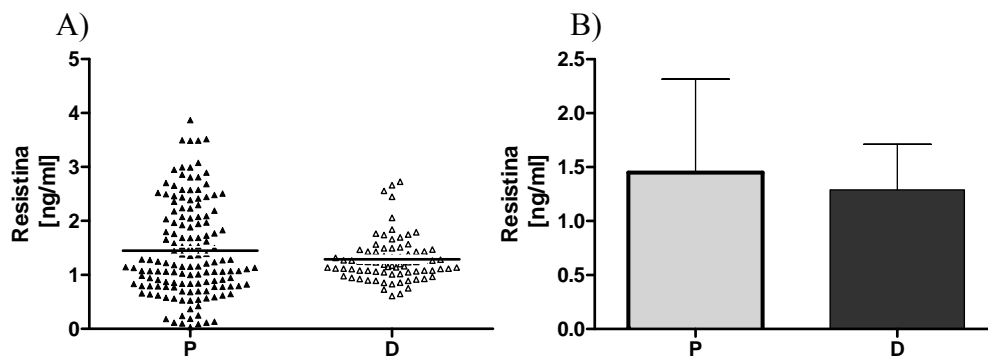


Figura 32.-Comparación de los niveles de Resistina en plasma de pacientes con AR y donadores. A) Gráfica de puntos donde se muestran los niveles diferentes encontrados entre donadores y pacientes. B) Gráfica de barras que muestra el promedio de las concentraciones de resistina, en sangre periférica de pacientes (P) y donadores (D) con la enfermedad. Las muestras evaluadas fueron 131 pacientes y 90 donadores, análisis realizado por prueba de Mann Whitney, $p=0.9314$, P respecto a D.

C) RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE RESISTINA Y ACTIVIDAD DE LA ENFERMEDAD.

Con base en los niveles de resistina para los pacientes, evaluamos la relación entre la actividad clínica (DAS28) y la concentración plasmática de esta adipocitocinas. Como se puede observar en la Figura 33, la prueba de correlación de Spearman resultó con una rho de 0.1736 p: 0.0433 sugiriendo que existe una asociación estadística entre estos dos parámetros.

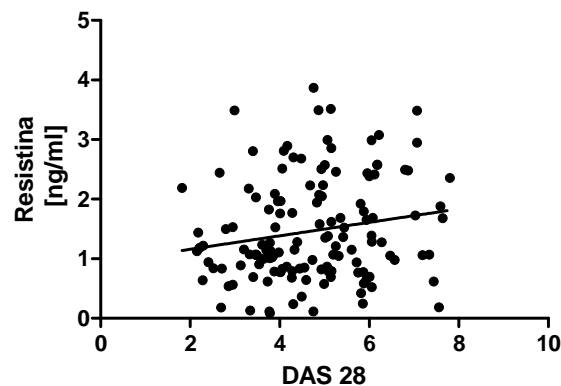


Figura 33. Relación entre el nivel de resistina plasmática y el grado de actividad. Los puntos corresponden al promedio de 3 evaluaciones independientes para cada paciente. La regresión lineal muestra la relación teórica entre la actividad y los niveles de resistina. Correlación significativa, con rho: 0.1736 (Spearman), p :0.0433, n=131.

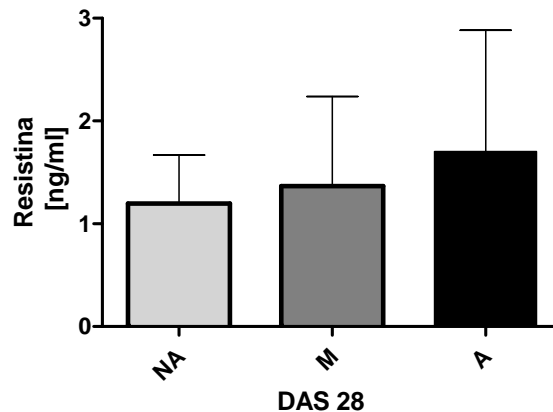


Figura 34.- Comparación del nivel de resistina plasmática entre los grupos de pacientes con AR divididos en base al grado de actividad. NA, corresponde a la enfermedad no activa (DAS28<2.6) n=8 y con un promedio de 1.197 ng/ml; M corresponde al nivel de actividad bajo (2.6-5.0) n=76 con un promedio de 1.348ng/ml; A, corresponde al nivel de actividad alto (DAS28>5.0) n= 60, con un promedio de 1.691, prueba de One way Anova p: 0.2073.

Como en los casos anteriores también estratificamos la población de pacientes para observar posibles relaciones en base a su nivel de actividad (ver sección leptina). Como se observa en la Figura 34, aunque los niveles de resistina fueron mayores en el subgrupo de pacientes con mayor actividad ($DAS28 > 5$), las diferencias no fueron estadísticamente significativas con los otros dos grupos de pacientes ($p = 0.2073$). La ausencia de correlación con la actividad clínica y su poca relación con algún subgrupo de pacientes permiten sugerir que los niveles de resistina no están asociados con la inflamación sistémica de los pacientes con AR.

D) RELACIÓN ENTRE EL NIVEL DE RESISTINA Y EL TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD

La evaluación de correlación estadística entre el tiempo de evolución del total de pacientes y los niveles plasmáticos de resistina dieron valores no significativos ($\rho = 0.054$ y $p = 0.5300$, datos no mostrados). Sin embargo, como se puede observar en la Figura 35A, encontramos un aumento significativo en los niveles de resistina en los pacientes de inicio reciente (< 1 año, $p < 0.05$), con respecto a los demás grupos, con mayor tiempo con los síntomas de la enfermedad. En esas circunstancias, se realizó un análisis de correlación de Spearman sólo con los pacientes de inicio reciente, como se puede ver en la Figura 35B. Una limitante importante para este análisis fue que contamos con una subpoblación de pacientes de AR temprana muy pequeña por lo tanto, no representativa de este grupo de pacientes.

Estos resultados permiten sugerir que a pesar de que los pacientes con AR parecen no mostrar niveles de resistina diferentes a los donadores sanos, un análisis del subgrupo de pacientes con AR de inicio reciente permite observar niveles de resistina significativamente diferentes al resto de pacientes con AR, así como al grupo de donadores. Independientemente de que la resistina pueda estar asociada a algún elemento clínico, estos resultados sugieren que los factores vinculados a provocar el incremento de resistina se hacen presentes sólo en los pacientes con AR de inicio reciente.

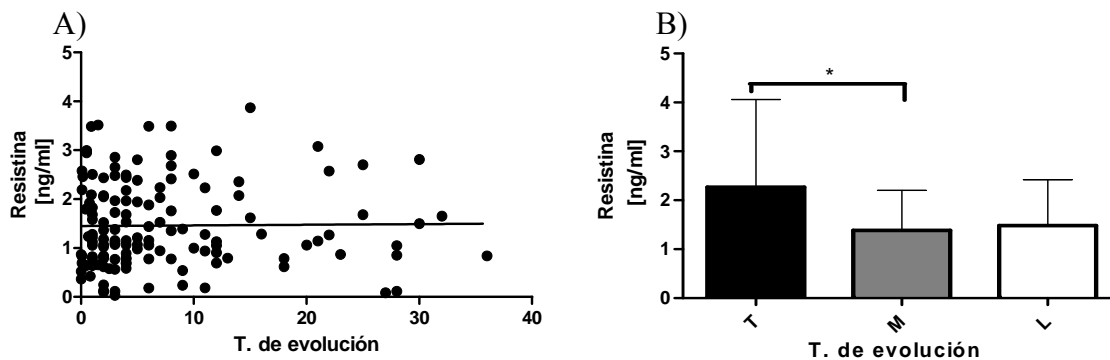


Figura 35.- Relación entre el tiempo de evolución y los niveles de resistina. A) Correlación entre los pacientes con AR y el tiempo de evolución, ρ : 0.05431, p : 0.5300, n = 131. B) Comparación en los niveles de resistina entre los grupos de pacientes con AR, divididos en base a su tiempo de evolución, (T, temprano n =11, M, mediana n =65 y L, larga evolución n =55). En este análisis se encontró una correlación entre el grupo T respecto al grupo M, p : 0.0375.

E) RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE RESISTINA Y EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC)

En base a estudios previos en la literatura especializada, y a semejanza de las otras adipocitocinas aquí descritas, se ha sugerido que los niveles de resistina se modifican como consecuencia del nivel de grasa corporal de los individuos. Así entonces, resulta importante estudiar la posible participación de este parámetro en los niveles de la resistina. Con ese objetivo, se aplicó la prueba de correlación de Spearman para los niveles de resistina y el IMC de los pacientes, resultando en la ausencia de asociación (ρ : 0.1118 y p : 0.2323, ver Figura 36). En la Figura 36 se observa la relación conjunta tanto de donadores como de pacientes para los parámetros: el IMC y los niveles de resistina. Como se mencionó anteriormente, el promedio del IMC fue similar entre las dos poblaciones (28.7 y 27.6 kg/cm^2 , para pacientes y donadores, respectivamente). A diferencia del perfil observado con la leptina y adiponectina, los niveles de resistina no fueron estadísticamente superiores a los observados en los donadores. De esto se puede concluir que los niveles de resistina no se alteran en respuesta a cambios en el IMC de los pacientes con AR.

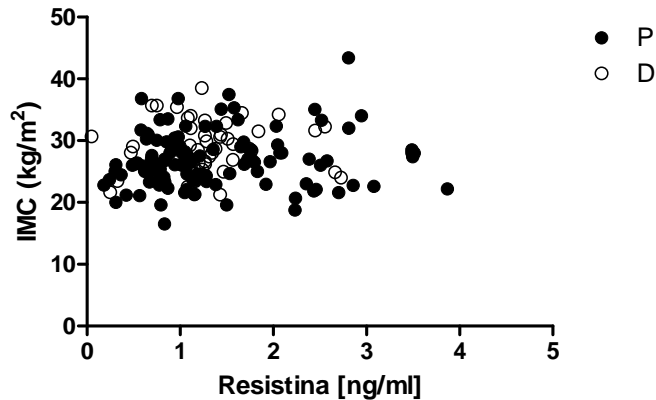


Figura 36. Relación entre el nivel de resistina plasmática y el IMC en donadores y pacientes con AR. Los círculos llenos corresponden a los pacientes (P) y los círculos vacíos corresponden a los donadores (D). Se muestra el promedio de 3 ensayos independientes para cada paciente (n=131) y donador (n=90).

F) RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE RESISTINA Y LOS AUTOANTICUERPOS

Considerando que varios estudios han observado que los niveles de autoanticuerpos FR y aPCC se relacionan con la actividad clínica en pacientes con AR, consideramos necesario analizar su posible relación con los niveles de resistina. En este contexto, realizamos la prueba de correlación de Spearman con los valores de los pacientes del presente estudio. Como se observa en la Figura 37, se evaluó la relación tanto de los niveles de FR (Figura 37A) como de aPCC (Figura 37B), con respecto a los niveles de resistina. En ambos análisis, los valores de correlación (FR, $\rho=0.06$, $p=0.4947$ y aCCP, $\rho=0.12$, $p=0.1476$) fueron bajos como para considerar una correlación significativa. En base a estos resultados podemos concluir que no hay una asociación estadística entre los niveles de resistina y alguno de estos dos índices de autoanticuerpos en los pacientes con AR.

A semejanza de lo observado con las otras adipocitocinas, también se compararon los niveles de resistina en subgrupos de pacientes, los cuales se separaron en base a sus niveles de autoanticuerpos (FR o aPCC); sin embargo en ninguno de estas comparaciones se encontró una diferencia significativa (Mann Whitney para FR $p=0.25$, para aPCC $p=0.84$) entre los grupos (datos no mostrados). Esto quisiera sugerir que los niveles

observados de resistina en los pacientes con AR no cambian en relación con los niveles de autoanticuerpos, impidiendo ver diferencias entre los subgrupos de pacientes.

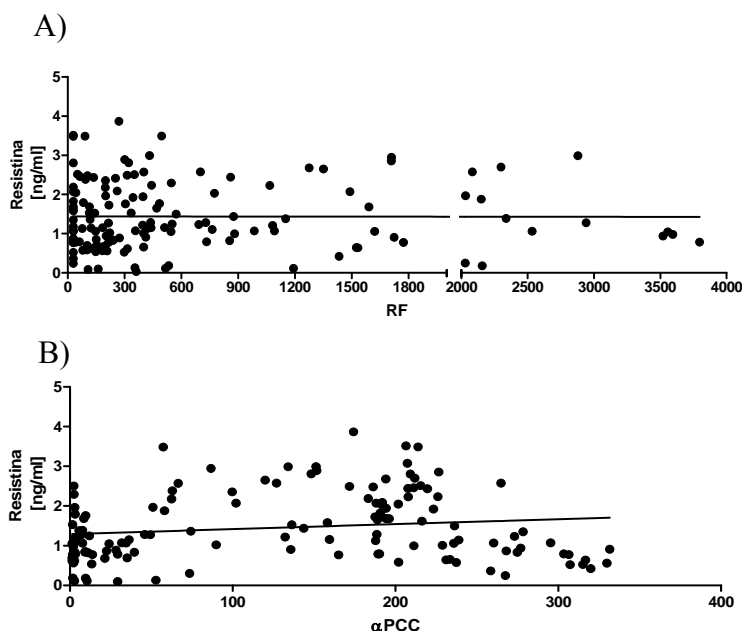


Figura 37.- Relación entre el nivel de resistina plasmática y el RF entre pacientes con AR
A) Correlación entre el RF del total de la población de pacientes y los niveles de resistina rho: 0.05757, p: 0.4947, n=131. B) Análisis de correlación entre los pacientes con AR y los niveles de resistina, rho: 0.1253, p: 0.1476, n=131.

G) RELACIÓN CON CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS

Se llevo a cabo el estudio de tres citocinas que participan en la inflamación como lo son el $\text{TNF}\alpha$, la IL-6 y la IL-17 con el fin de obtener una imagen más integral del papel de las adipocitocinas, puesto que se realizaron análisis de correlación de cada citocina inflamatoria respecto a cada adipocitocina, así se encontró una correlación inversa significativa con las tres citocinas en estudio.

La citocina IL-17 correlaciona de manera significativamente inversa con resistina, prueba de Spearman rho: -0.1985 p: 0.0200., $\text{TNF}\alpha$ rho:-0.2313p: 0.0085, e IL-6 rho: 0.2431, p: 0.0037.

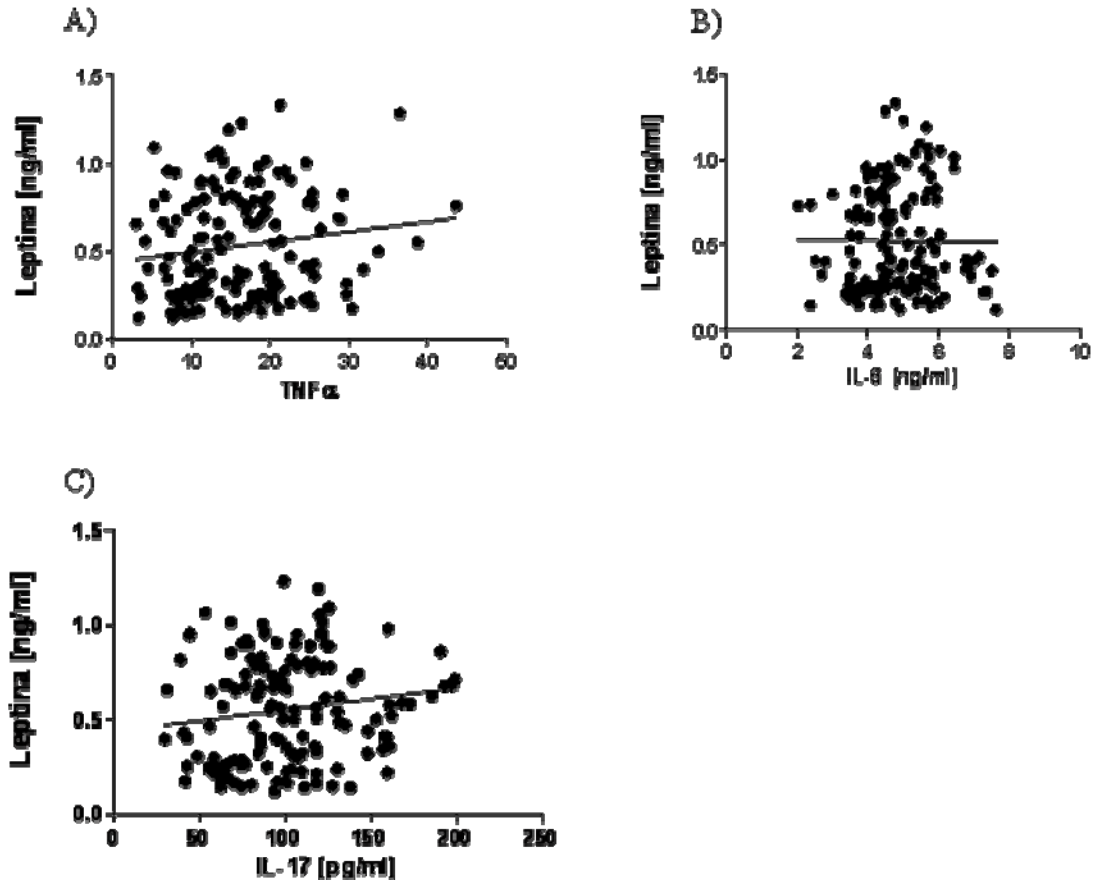


Figura 38 : Correlación de adipocitocina resistina y citocinas inflamatorias en pacientes AR. .
 A) Correlación significativa entre resistina y TNF α rho: -0.2313p: 0.0085 B) Correlación entre resistina e IL-6 rho: 0.2431, p: 0.0037 C) Correlación significativa entre resistina e IL-17 rho: -0.1985, p: 0.0200.

VII. DISCUSION Y CONCLUSIONES

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad muy compleja, la cual dista mucho de ser comprendida totalmente, por ello consideramos que su estudio desde distintos enfoques podría ser importante para obtener resultados con mayor aplicabilidad. En el presente estudio, nos centramos en la evaluación de los niveles plasmáticos de las adipocitocinas y su posible relación con los parámetros clínicos de pacientes con AR. Debido a que la capacidad de estas proteínas para regular la respuesta inmunológica resulta aún novedosa, consideramos importante determinar los niveles de las adipocitocinas presentes en los pacientes con esta enfermedad autoinmune, ya que servirá como base para diseñar estudios *in vitro* con el fin de profundizar sobre los mecanismos de acción de las adipocitocinas que en las células del sistema inmune.

A) POBLACIONES EN ESTUDIO

Para el presente estudio se requirió de la colaboración del Servicio de Reumatología del Hospital General de Cuernavaca (bajo la tutela del Dr Xibille-Friedmann) y del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea (responsable. Dra. Cordero). Todos los donadores y pacientes incluidos en el presente estudio, se les pidió su consentimiento informado y firmado. Asimismo, el presente protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital General de Cuernavaca (2009).

Aunque aún no se conoce la prevalencia de la AR en la población Mexicana, se considera que esta oscila entre 0.4 y 0.8% de la población. Resultados muy recientes de un estudio de prevalencia de nuestros colaboradores en la Cd. de México y Monterrey parecen coincidir muy bien con esta estimación. En ese sentido y considerando una variación de los resultados experimentales de alrededor del 5% y una potencia del 90%, se requeriría de un tamaño de muestra de 100 sujetos por grupo. Como podemos ver en la Tabla 4, esto se cumplió con la población de pacientes aunque faltaron algunos donadores. Es conveniente aclarar que algunos donadores fueron excluidos del estudios ya que mostraron índices de IMC y edad diferentes del grupo de pacientes, por lo que preferimos aparear las poblaciones de estudio en base a estos parámetros, en lugar de completar los grupos. En este sentido,

podemos considerar que los resultados de la presente cohorte de pacientes con AR estadísticamente representativas de la población mexicana, por lo que nuestras conclusiones podrían ser extrapolables. Sin embargo y dado que se obtuvieron resultados diferentes al analizar entre subgrupos de la población total de pacientes con AR, sería recomendable aumentar el tamaño de muestra con el fin de mejorar la representatividad de los subgrupos.

Considerando que factores tales como el género (M/H) y la proporción de grasa corporal (IMC) se considera que modifican los niveles de adipocitocinas (Swchartz 1997, Arita 1999, Mc Ternan 2002), nuestro diseño inicial fue comparar entre pacientes y donadores que coincidan en estos parámetros. Como podemos confirmar en la Tabla 4,(sección 6.1) tanto la proporción mujeres vs hombres (15.6 vs 17, pacientes vs donadores, respectivamente), como el IMC (26.7 vs 28.7, pacientes vs donadores, respectivamente) son estadísticamente similares. De estos resultados podemos concluir que las poblaciones de pacientes y donadores son semejantes.

B) EVALUACIÓN METODOLÓGICA

En el presente estudio, se estandarizaron el protocolo de ELISA para la determinación de los niveles plasmáticos de las adipocitocinas y citocinas. Como se puede observar, tanto en la sección de resultados, como en los apéndices, en todos los casos se determinó la concentración del mensajero químico por la interpolación en una curva patrón realizada con la proteína recombinante humana. Para esta interpolación se empleó la sección de las curvas patrón que mostraron una relación lineal entre la DO_{490nm} y la concentración de proteína (r^2 entre 0.8 y 0.95), lo cual indica una fuerte correlación entre los valores experimentales (DO_{490}) el valor teórico (concentración de citocina).

La reproducibilidad de las valoraciones se garantizó por la realización de ensayos por triplicado para cada muestra en evaluación. Posteriormente, las muestras que observaron una desviación estándar mayor al 20% de la media aritmética, fueron re-analizados para confirmar el resultado experimental. De esa manera, se obtuvieron valoraciones reproducibles en todos los casos. Finalmente, con el fin de comparar los valores entre los diferentes ensayos, en todas las placas de ELISA se incluyó una muestra control (donador); permitiendo ajustar los valores entre conjuntos de ensayos.

Un aspecto particularmente crítico en la determinación cuantitativa de citocinas es la sensibilidad de la técnica empleada. Debido a que la sensibilidad depende, entre otros factores, de la afinidad del anticuerpo por la citocina de interés, los parámetros de los protocolos para cada citocina serán particulares dependiendo de cada proveedor de anticuerpos. En nuestro caso, se obtuvieron curvas patrón entre 0.1 y 10 ng de proteína, que nos permitió la evaluación de prácticamente todas las citocinas a nivel sanguíneo. Desafortunadamente, esto no fue el caso para la determinación de citocinas en el sobrenadante de cultivo, debido a que se encontraba seguramente en niveles de concentración menores (<100 pg).

C) RELACIÓN ADIPOCITOCINAS Y ACTIVIDAD CLÍNICA.

En este estudio, se observó que la leptina estaba significativamente más elevada en pacientes con AR respecto a donadores (t de Student <0.05%), lo cual podría sugerir su posible participación como un factor pro-inflamatorio. Como se describió en la introducción, varios estudios muestran que leptina induce activación de la respuesta inflamatoria, tanto en la inducción de citocinas pro-inflamatorias, como en la regulación de la activación y diferenciación celular de células inmunes (Mattioli 2005, Martín-Romero 2000). En este mismo sentido, otros grupos han evaluado la posible relación clínica entre estos factores adipogénicos y la actividad clínica en pacientes con AR (ver Tabla 2), sin embargo, al evaluar con detalle los diferentes estudios se puede decir que no se puede dar una conclusión. Primero, los estudios presentaron diseños muy diferentes entre ellos; segundo, la variación en las características antropométricas y genéticas de las diferentes poblaciones estudiadas ocasionó la obtención de resultados muy dispares; tercero, las técnicas de evaluación fueron diferentes. Todo esto, en lugar de ayudar, dificulta en el establecimiento de una propuesta científica. En ese sentido se puede observar que algunos grupos reportan una asociación significativa entre los niveles de leptina y la actividad (Otero et al, 2006; Targonska-Stepniak et al, 2008; Targonska-Stepniak et al, 2010), pero otros estudios no observaron esta relación (Popa et al, 2005; Bokarewa et al, 2003). A pesar de todo esto, y considerando que la prevalencia de sobrepeso-obesidad es muy alta en la población mexicana, consideramos que sería importante determinar el nivel basal de

estas adipocitocinas en la población sana de nuestro país, al tiempo de comparar con los pacientes con AR.

En relación a esto, se ha observado que la leptina induce la proliferación y activación de linfocitos T, al tiempo que induce la expresión de citocinas pro-inflamatorias como $\text{TNF}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$, las cuales parecen ser importante en las manifestaciones clínicas de los pacientes (Lord et al, 1998). Su aumento podría sugerir que la leptina podría estimular la respuesta inflamatoria de los pacientes, y por ende, sus síntomas. En este sentido, nuestros resultados mostraron una diferencia significativa entre pacientes y donadores que coincide con el papel pro-inflamatorio de la leptina, sin embargo, cuando evaluamos su asociación con la actividad clínica de la enfermedad, obtuvimos una correlación significativa pero muy baja (ρ de Spearman=0.23, $p<0.05\%$). En base a estos resultados, uno podría proponer que la relación entre la leptina y la AR es indirecta y posiblemente, vinculada a las citocinas y/o activación de células inmunes en los pacientes. A semejanza de nuestro resultados, otros estudios observado una diferencia entre donadores y pacientes, sin obtener una asociación estadísticamente significativa (Popa et al, 2005).

Por otro lado, como una estrategia para re-analizar las posibles relaciones entre los niveles de adipocitocinas y parámetros clínicos estratificamos nuestra población de pacientes en 3 grupos, en base a su actividad clínica (no activo, medio y alta actividad, ver Sección Resultados). Así pudimos observar que los pacientes con niveles menores de leptina fueron aquellos sin actividad ($\text{DAS28}<2.6$). Sin embargo este grupo estuvo constituido sólo por 8 pacientes, a diferencia de los grupos con baja ($n=76$) y alta actividad ($n=60$). En este sentido, otra limitante del presente estudio fue el no contar con un número suficiente de pacientes con baja o nula actividad (remisión) que permitiera confirmar esta relación. En el otro sentido, nuestros resultados parecerían sugerir que los niveles mayores de leptina se presentan en pacientes con mayor actividad ($\text{DAS28} >5.0$). Estos resultados sugieren que la leptina podría tener un efecto más relevante en los pacientes con AR severa, a diferencia de los otros grupos de pacientes. Para evaluar esto, será necesario profundizar en los efectos inflamatorios inducidos por la leptina en las células *ex vivo* de pacientes con AR. Adicionalmente, como se describirá más adelante, esto podría sugerir que la leptina puede ser empleado como un biomarcador del nivel de actividad clínica, lo cual orientaría al reumatólogo sobre la respuesta al tratamiento y la evolución del paciente.

Al evaluar la relación entre los parámetros generales de los pacientes y los niveles de leptina, observamos una clara diferencia entre los dos grupos (ver Figura 14), a pesar de contar con una relación M/H e IMC similar entre los donadores y pacientes. En base a estudios clásicos donde se observó la relación directamente proporcional entre el aumento del IMC y los niveles de leptina (Swchartz et al, 1997), esperábamos que esto se mantendría en el grupo de pacientes, sin embargo no encontramos una asociación significativa. Todo esto nos permite sugerir que el incremento de leptina en los pacientes con AR no ocurre como consecuencia de la acumulación de grasa corporal, sino más bien sería consecuencia de la respuesta inflamatoria del individuo. El efecto fisiológico de los niveles altos de leptina inducido durante los procesos inflamatorios requiere un estudio más detallado, toda vez, que prácticamente se desconoce.

Al evaluar la relación entre el tiempo desde la aparición de los síntomas y los niveles de leptina, no observamos una asociación significativa. Sin embargo, al estratificar la población en base al tiempo de evolución, los mayores niveles de leptina se observaron en los pacientes con AR establecida (> 1 año desde inicio de los síntomas). En un estudio previo se observó que los niveles de leptina se incrementaron en pacientes con AR sobretodo en pacientes con tiempo de evolución mayor a 10 años; esto nos refuerza nuestra propuesta de que la estimulación de leptina sucede en una fase crónica de la enfermedad. Esto permitiría plantear al menos dos hipótesis: 1) que el incremento de leptina podría favorecer la instauración del estado crónico de la enfermedad ó 2) también, constituir una consecuencia del tratamiento prolongado con anti-inflamatorios (AINES y FARMES). En todo caso, cualquiera de las dos propuestas sería interesante poder abordarla, en parte, porque no existe (a nuestro conocimiento) antecedentes en la literatura especializada; al tiempo que podría sugerir el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para los pacientes con AR en el control de la respuesta inflamatoria autoinmune.

La AR se caracteriza por ser un proceso inflamatorio crónico en donde los sistemas de tolerancia inmunológica, tales como la muerte celular parecen perder su control. En este sentido, también podría sugerirse que la leptina podría favorecer la activación y sobrevida de los linfocitos T infiltrados en la articulación inflamada. Acorde con esto, se ha demostrado que la leptina promueve la sobrevivencia de los linfocitos T modulando la expresión de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-xL, en la apoptosis inducida por estrés

(Fujita et al, 2002). De esta manera, se podría favorecer el estado inflamatorio crónico en los pacientes con AR.

A semejanza de lo observado con la leptina en el presente estudio observamos un aumento significativo en el nivel de adiponectina en el plasma de los pacientes con AR, con respecto a los individuos sanos. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos de otros grupos (Otero et al, 2006). Sin embargo, llama la atención porque esta molécula se ha asociado preferentemente con efectos anti-inflamatorios (Chen 2006). Cuando se evaluó su relación con la actividad de la enfermedad no observamos una correlación significativa; sin embargo, a semejanza de la leptina, los pacientes con mayor nivel de actividad presentaban niveles mayores de adiponectina (ver Figura 16). Aunque algunos estudios han sugerido la participación de adiponectina en el proceso inflamatorio crónico de pacientes con AR (Otero et al, 2006), otros estudios sugieren que son elementos independientes (Senolt et al, 2006). Nuestro estudio carece de elementos suficientes para proponer la participación de la adiponectina durante la AR. Es sin embargo, importante señalar que los niveles basales en los pacientes con AR son estadísticamente mayores que los donadores. Este resultado podría explicarse sugiriendo que los niveles de adiponectina se elevan como un mecanismo de control anti-inflamatorio, situación que se ha reportado por el incremento de leptina o citocinas pro-inflamatorias como IL-6 (Tang et al, 2007). En el mismo sentido, nosotros y otros grupos hemos observado que otro factor anti-inflamatorio conocido: el TGF- β , se eleva significativamente en los pacientes con AR, pero sólo a nivel articular; sin observarse diferencias con donadores a nivel periférico. Al evaluar la respuesta *ex vivo* de las células sinoviales de pacientes con AR a la activación de esta citocina observamos importantes deficiencias: 1) observamos que sus receptores específicos disminuyen en la membrana; 2) presentaron menor capacidad para inducir la fosforilación de Smad 2/3 al incubar *in vitro* con TGF- (manuscrito en preparación). En un contexto semejante, podríamos pensar que el incremento de adiponectina podría ser una respuesta a la inflamación sistémica, y por si mismo, constituir un sistema de control anti-inflamatorio. Sin embargo, se requiere profundizar el estudio del efecto de la adiponectina para poder sugerir su función anti-inflamatoria. Sin embargo, resulta paradójico que los pacientes con AR que presentan mayores niveles de adiponectina, son aquellos que tienen una actividad mayor.

Como se describió en la sección de antecedentes, se ha sugerido una relación inversamente proporcional entre los niveles de adiponectina y el IMC. Sin embargo, en este estudio no pudimos observar esta relación en los pacientes con AR. Esto parecería sugerir que el proceso autoinmune constituye un estimulador importante para la secreción tanto de leptina como de adiponectina. Será preciso ampliar estos estudios en modelos *in vitro* para poder disectar los factores responsables de los niveles plasmáticos de estas adipocitocinas.

A diferencia de lo observado con leptina, los niveles mayores de adiponectina se observaron en los pacientes con inicio reciente, aunque tampoco se pudo establecer una correlación significativa. Esto permitiría sugerir que los factores inductores de la secreción de adiponectina aparecerían temprano durante la evolución de la enfermedad. Asimismo, uno podría sugerir que la estimulación de la secreción de adiponectina podría bloquearse en el establecimiento del estado crónico de la AR, de ahí que observamos niveles mayores de esta adipocitocina fundamentalmente en el plasma de pacientes de inicio reciente.

Es difícil proponer la participación de la resistina durante el desarrollo de la AR. Primero, no observamos una diferencia significativa entre donadores y pacientes con AR; aunque se puede observar una tendencia a presentar niveles mayores en los pacientes. Al estratificar los pacientes en base al tiempo de evolución, observamos que los pacientes de menor tiempo desde el inicio de los síntomas, son quienes muestran niveles mayores de resistina. Por otro lado, a diferencia de lo observado con leptina y adiponectina, no se observaron cambios en su concentración por efecto del proceso inflamatorio, actividad clínica, IMC y niveles de autoanticuerpos.

A diferencia de otros estudios (Migita et al, 2006; Senolt et al, 2007) donde se ha descrito una relación entre los niveles altos de resistina y la actividad inflamatoria en los pacientes con AR, aquí no observamos estos cambios. Un aumento en el tamaño de la población de pacientes, posiblemente no influya significativamente, toda vez que el presente estudio comprende una población mayor de pacientes (131, este estudio vs 42 Migita, 2006). Una posible explicación de los resultados sería considerar las diferencias genéticas de las poblaciones de estudio: se observó un cambio de resistina en población japonesas (Migita et al, 2006) y centroeuropea (Senolt et al, 2007), pero en la población mestiza mexicana, los resultados fueron negativos. En este sentido, sería interesante

comparar los elementos característicos de predisposición genética entre estas poblaciones: HLA-DRB1, epítotope compartido, polimorfismos para TNF- α , PTN22, etc.

D) RELACIÓN DE ADIPOCITOCINAS Y AUTOANTICUERPOS.

Dado que los niveles de autoanticuerpos constituyen las herramientas diagnósticas más empleadas, tanto por su presencia desde tiempos tempranos como su buena relación con la actividad clínica de los pacientes con AR. Uno de las contribuciones importantes de este estudio fue evaluar la posible relación entre los niveles de autoanticuerpos y las adipocitocinas en este tipo de pacientes. En este sentido, aunque observamos una correlación positiva entre los autoanticuerpos aPCC y los niveles de leptina ($\rho=0.16$) y adiponectina ($\rho=0.13$), los valores fueron poco significativos. Por el contrario, observamos un nivel mayor de asociación con los títulos de FR para leptina ($r=0.33$) y para adiponectina (0.29). Resulta significativo que cuando se evaluó sólo a los pacientes con títulos mayores de 500 U/ml de FR observamos un incremento en el valor de correlación. Para leptina aumento de 0.33 a 0.54 y para adiponectina aumentó de 0.29 a 0.50. Esto podría sugerir una relación directamente proporcional entre los niveles del FR y los niveles de estas adipocitocinas en los pacientes con mayor actividad y con niveles elevados de autoanticuerpos.

Sin embargo, estos resultados no nos da información sobre los mecanismos funcionales entre estos dos factores. Asimismo, el hecho de poder encontrar una clara correlación entre el FR y los niveles de adipocitocinas, da valor a nuestra propuesta de utilizar a estas adipocitocinas como biomarcadores del estado clínico de los pacientes con AR. Es necesario considerar que varios estudios han propuesto que la capacidad predictiva es mayor de la presencia de aCCP, en comparación con los títulos de FR sin embargo, no se conoce los mecanismos de generación de cada uno de estos autoanticuerpos como para poder explicar su nivel de especificidad.

E) RELACIÓN ADIPOCITOCINAS Y CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS.

Resultó interesante encontrar una correlación positiva entre indicadores de un proceso inflamatorio con AR, como son las citocinas pro-inflamatorias y las adipocitocinas.

Particularmente, la posible relación entre IL-17 y leptina podría ser muy significativa dado que esta citocina está asociada a procesos inflamatorios crónicos y erosión ósea que son los casos más graves de la AR. En este sentido, se podría sugerir que la leptina podría participar en la activación, diferenciación y supervivencia de células secretoras de IL-17 (linfocitos T, Th17). A nuestro conocimiento, sólo existe un estudio previo, con células mononucleares de sangre periférica de pacientes de la enfermedad Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), se observó que estimulación con leptina estimulaba la secreción de IL-17 Liu et al, 2008). Una de las perspectivas más interesantes de este estudio, será evaluar *in vitro* la relación entre la leptina y la secreción de IL-17 en linfocitos T CD⁴⁺.

En este estudio observamos que los niveles altos de adiponectina se asocian de manera significativa con un incremento en los niveles de TNF- α . En este sentido, algunos estudios recientes sugieren que la citocina TNF- α induce la inhibición de adipocitocinas como adiponectina y visfagina (Li et al, 2009). Lo cual podría sugerir, por un lado, que el incremento de TNF- α y el estado crónico de la AR, podría inducir una disminución en los niveles de adiponectina. Sin embargo, esto solo no podría explicar la relación positiva que observamos entre estas dos moléculas. En otras situaciones patológicas, como la hipertensión (Patel et al, 2009) y la infección por *Mycobacterium avium* (Tasaka et al, 2010), se ha observado una relación positiva entre la adiponectina y el TNF α , parecido a nuestros resultados del presente estudio. Sin embargo, hay un número importante de reportes donde la relación observada entre estos elementos es negativa: el aumento de uno de ellos, implica la disminución del otro (Lee et al, 2008; Serelis et al, 2008). De acuerdo a varios otros estudios, aquí observamos que los niveles plasmáticos del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) fueron significativamente mayores en los pacientes. Asimismo se ha podido demostrar por otros grupos que esta citocina participa activamente en la patogénesis de la AR al favorecer la inflamación persistente en las articulaciones, la destrucción de cartílago articular y la erosión de hueso, proceso característico de esta enfermedad (Choi et al, 2001).

F) PARTICIPACIÓN DE LAS ADIPOCITOCINAS EN EL DESARROLLO DE LA AR.

En base a los antecedentes de la literatura, se podría sugerir que un aumento sistémico de leptina en los pacientes con AR, podría contribuir de manera importante a incrementar el nivel inflamatorio (aumento de TNF- α , IFN γ y activación de linfocitos T). El aumento de adiponectina podría sugerir la presencia de un sistema de control de la inflamación, donde el aumento de esta adipocitocina podría inhibir las señales de la leptina o del TNF- α . Sin embargo, en pacientes con tiempo de evolución más prolongado, la sensibilidad al efecto de adiponectina podría verse inhibido (resistencia a la adiponectina), quizás por la disminución en los receptores membranales y por tanto favoreciendo un estado inflamatorio (aumento de TNF- α).

En base a previos estudios, se sugiere que el incremento de los niveles de leptina podría ser un estimulador del proceso inflamatorio, durante el desarrollo de la AR (ver Figura 14). En este contexto, la leptina podría favorecer la proliferación, sobrevivencia y diferenciación de células autorreactivas. De manera indirecta podría estimular la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α . En este sentido, sería muy interesante verificar la propuesta aquí generada de que la leptina podría favorecer la diferenciación de linfocitos T hacia la subpoblación de Th17, células productoras de IL-17. Esto último podría explicar la asociación que observamos en el presente trabajo, entre los niveles de leptina e IL-17 en la sangre de pacientes con AR. Por otro lado, la leptina podría estimular la activación y diferenciación de linfocitos B autorreactivos y por ende, favorecer la síntesis de autoanticuerpos. Esto último podría sugerirse de la relación positiva entre el aumento de leptina y los títulos de FR en los pacientes.

Resulta significativo que el incremento de leptina ocurre de manera independiente a la proporción de grasa corporal, por lo que se podría sugerir dos explicaciones: 1) Durante la inflamación crónica, los adipocitos son estimulados a secretar más leptina; 2) Las otras fuentes de leptina son el blanco de la estimulación inflamatorio. Resultados de este estudio sugieren que la leptina se encuentra en niveles elevados en pacientes con AR establecida (> 1 año desde el inicio de los síntomas) por lo que podría sugerirse que es consecuencia de la inflamación inducida durante la AR. Sin embargo, podría participar en el establecimiento

del estado crónico de la enfermedad, la actividad y la respuesta al tratamiento. En cualquiera de estos casos, según el esquema aquí propuesto (ver Figura 38), la regulación farmacológica de los niveles de leptina podría ayudar en el control del proceso inflamatorio y de los síntomas en los pacientes con AR.

Finalmente se ha sugerido en varios estudios que la adiponectina desempeña un papel anti-inflamatorio sea por la inhibición de las acciones de la leptina o resistina, o por su efecto bloqueando la secreción de citocinas pro-inflamatorias. En este contexto, la presencia de niveles significativamente elevados en los pacientes con AR parece ofrecer una situación contraria, donde la adiponectina podría participar de alguna manera en el estado inflamatorio crónico y favorecería la respuesta autoinmune (ver Figura 38). La presencia de niveles elevados de adiponectina en el plasma de pacientes con AR ya se ha descrito también por otros autores (Otero et al, 2006; Tan et al, 2009), lo que apoya nuestros resultados. Sin embargo, no se ha podido dar una explicación funcional, que explique a cabal medida su función en la AR.

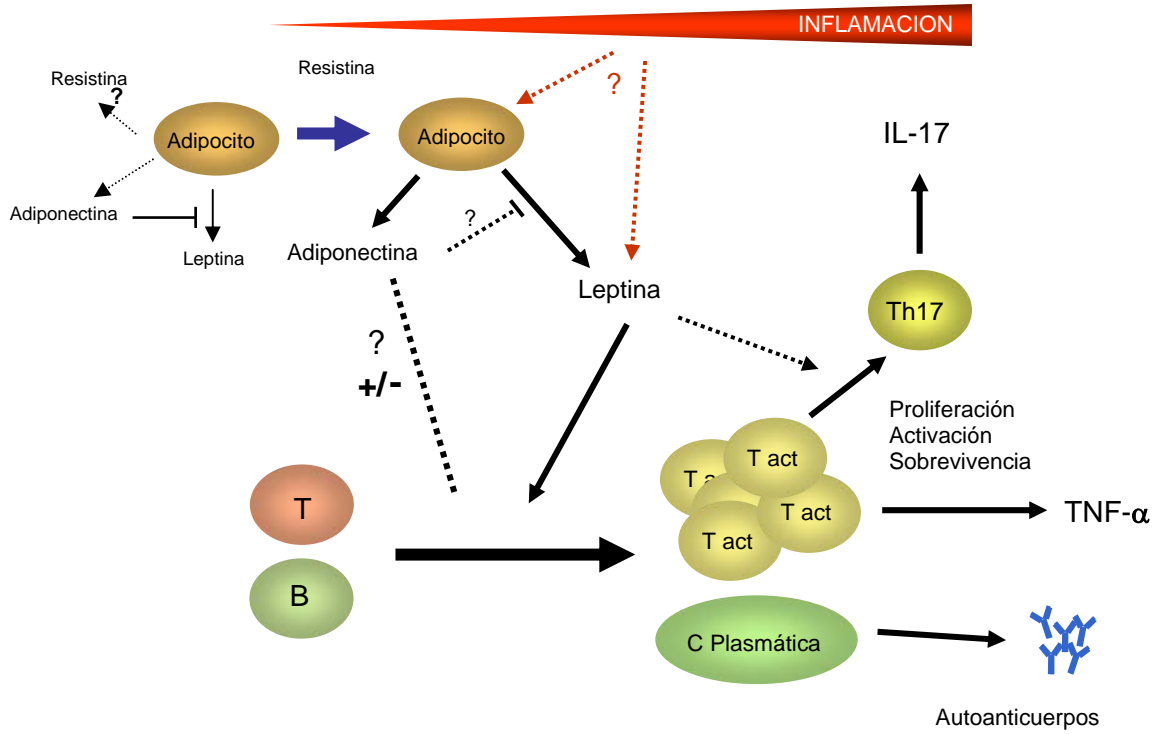


Figura 38.- Posible participación de las adipocitocinas en el proceso inflamatorio inducido durante el desarrollo de la artritis reumatoide (AR). El adipocito secreta adiponectina, de la cual se desconoce su perfil inflamatorio, podría estar compitiendo con leptina tratando de menguar la inflamación o estar promoviéndola; por otro lado el adipocito secreta leptina la cual promueve la expresión de citocinas inflamatorias así como la activación y diferenciación de algunos estirpes celulares como el TH17, así también las adipocitocinas podrían influenciar la expresión de autoanticuerpos. El papel de resistina no está bien esclarecido aunque pareciera tener un perfil inflamatorio.

VIII. PERSPECTIVAS

- 1.- Con el objetivo de encontrar asociaciones significativas entre los parámetros clínicos y los niveles de citocinas/adipocitocinas, se propone incrementar el número de pacientes y donadores incluidos en este estudio.
- 2.- Con el fin de confirmar la asociación observada entre los niveles de las adipocitocinas y la respuesta inmune, sería necesario realizar estudios *in vitro* con modelos celulares (células Jurkat) o con células T derivadas de sangre periférica de donadores o pacientes con AR. En estos estudios, se pretendería evaluar las consecuencias celulares y funcionales de la incubación con leptina y/o adiponectina.
- 3.- La alteración de los receptores para las adipocitocinas y/o los intermediarios de señalización claves para el efecto inducido por leptina y adiponectina podría inducir cambios en la respuesta inmunológica como la inducción de la secreción de citocinas pro-inflamatorias (p. ejemplo, TNF- α o IL-17).

APENDICE A (IL-6)

Para determinar la concentración de IL-6 a partir de la densidad óptica (DO), se estandarizó una curva patrón con la proteína IL-6 recombinante humana (Prepotech Cat: 200-06 Lot: 0203B16 F2508) resultando en una curva con una pendiente 0.1236 un valor de ordenada al origen de -0.0015. En base a los anteriores parámetros y considerando el factor de dilución de la muestra a evaluar, se pudo obtener las concentraciones, en unidades de ng/ml. El grado de confiabilidad de nuestra estrategia de cuantificación, nos la proporcionó el factor de correlación (r^2), que este caso fue de 0.9986, como se ve en la Figura 39

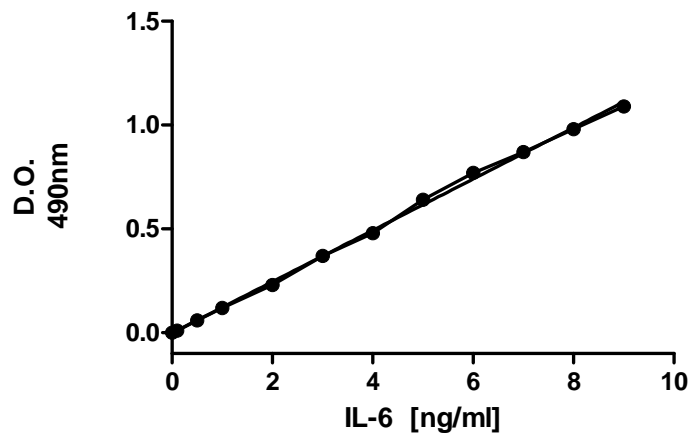


Figura 39.- Curva patrón para IL-6. La siguiente curva patrón resultó de 3 diferentes ensayos independientes. Los resultados se presentan como la media y la desviación estándar, para cada concentración.

Comparación de niveles de IL-6 entre donadores y pacientes con AR.

En este estudio observamos que que los niveles de IL-6 en suero son un poco más elevados en donadores con respecto a los pacientes (pacientes 5.119 ± 0.1044 y donadores 5.393 ± 0.1078 ng/ml, (ver Figura 40), sin embargo esta diferencia resultó no significativa al evaluar mediante la prueba de Mann Whitney: $p: 0.0778$.

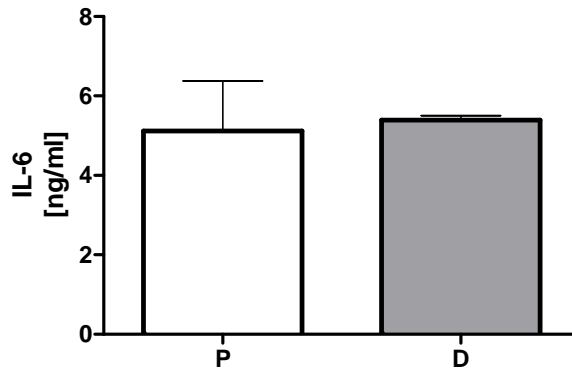


Figura 40.- Niveles de IL-6 en plasma encontrado entre pacientes con AR y donadores Gráfica de barras que muestra el promedio de las concentraciones de IL-6, en sangre periférica de pacientes (P) y donadores (D) con la enfermedad. No se observó diferencia significativa $p: 0.0778$, $n=131$.

Por otro lado, al evaluar la relación entre la actividad de la enfermedad de los pacientes con AR y los niveles plasmáticos de IL-6 no se encontró una correlación significativa ($\rho: 0.07446$, $p: 0.3861$), como se muestra en la Figura 41A. Asimismo, tampoco observamos una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de IL-6 y el tiempo de evolución ($\rho: -0.07653$, $p=0.3741$, ver Figura 41B), o el índice de masa corporal (41C). Conviene considerar que a pesar de no observar una relación estadística entre el tiempo transcurrido desde la primera observación de síntomas y los niveles de IL-6, se observa un aumento de esta citocina en los pacientes con mayor tiempo de evolución (> 20 años).

Al analizar la relación entre los niveles de IL-6 con los títulos de autoanticuerpos aCCP encontramos una correlación estadística ($\rho: 0.1796$, $p: 0.0312$) (ver Figura 41D). También observamos una diferencia significativa en los niveles de IL-6, al comparar los grupos de pacientes en base a su título de aPCC (bajo < medio, $p=0.044$; bajo < alto, $p=0.018$, datos no mostrados). Esto podría sugerir que habría una tendencia a presentar niveles mayores de esta citocina en los pacientes con niveles altos de este autoanticuerpo.

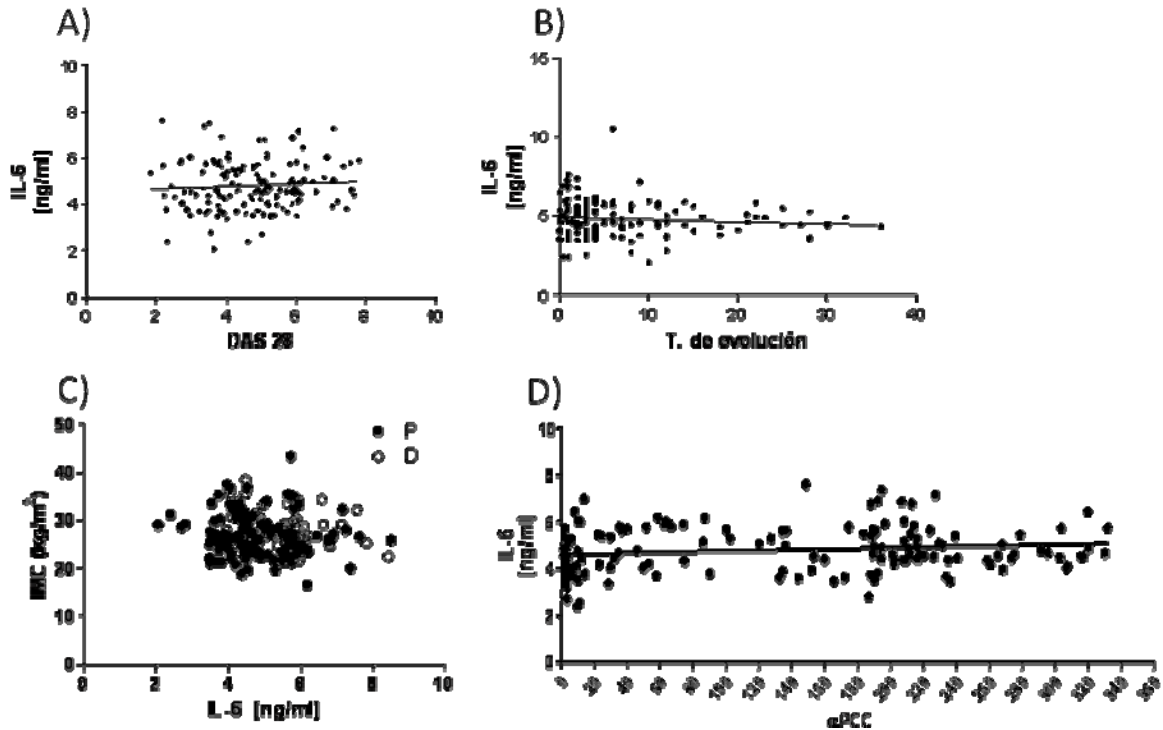


Figura 41.- Relación entre la actividad, el tiempo de evolución, el IMC y el título de aPCC con los niveles de IL-6. A) Correlación entre la actividad (DAS28) y los niveles de IL-6 (ρ :0.07446, p : 0.3861); B) Correlación entre el tiempo de evolución de la población de pacientes y los niveles de IL-6 (ρ : -0.076539, p : 0.3741); C) Correlación entre el IMC de la población de pacientes y los niveles de IL-6 ; D) Correlación entre el título de aPCC de pacientes y los niveles de IL-6 (ρ : 0.1796, p : 0.0312), $n=131$.

Algo similar ocurrió al comparar los niveles de citocina y de FR, tampoco se observó una correlación estadística ($\rho=0.268$, $p= 0.0012$, datos no mostrados), pero si hay una diferencia al comparar los niveles de citocina entre los pacientes con niveles menores a 200 U/ml vs aquellos con niveles mayores (Mann Whitney, $p=0.0256$). Esto podría también sugerir que habría una tendencia en los pacientes con niveles altos de este autoanticuerpo y posiblemente, con mayor actividad de la enfermedad.

APENDICE B (TNF- α)

Para la determinación de la concentración de TNF α se estandarizó una curva patrón, empleando como estándar la proteína TNF α recombinante humana (PeproTech. No: Cat.# 300-01A. Lot# 0604CY25 K155). Esta curva patrón nos permitió establecer la relación entre el cambio de concentración de la proteína y la densidad óptica. Esta relación puede caracterizarse por una pendiente de 0.01132 y un valor de ordenada al origen de 0.1488 (ver Figura 42). En base a los anteriores parámetros, y considerando el factor de dilución de la muestra a evaluar, se pudo determinar las concentraciones, en ng/ml, para las muestras plasmáticas tanto de donadores como pacientes con AR. El grado de confiabilidad de nuestra estrategia de cuantificación, nos la proporcionó el factor de correlación (r^2), que en caso de la curva de TNF α fue de 0.9112.

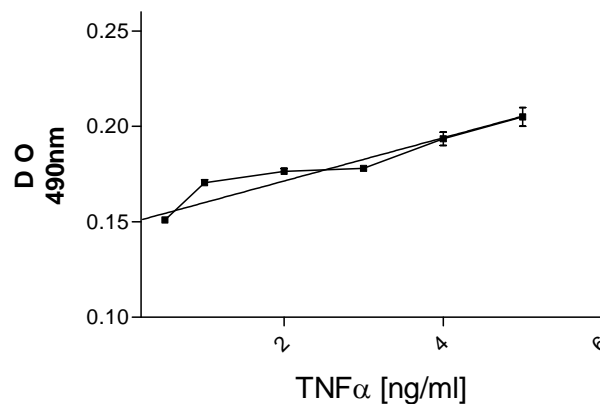


Figura 42.- Curva patrón para TNF α . Se cuantificó la concentración de TNF α por elaboración de una curva patrón a diferentes concentraciones y empleando TNF α humana recombinante, n=3, p: 0.9112.

Niveles de TNF- α en pacientes con AR.

En el presente estudio, los niveles de TNF- α fueron significativamente mayores en pacientes con respecto a los donadores, (pacientes 16.07 ± 0.61 y donadores 8.51 ± 0.70), al evaluar mediante la prueba de Mann Whitney ($p < 0.0001$), como se observó en la Figura 43.

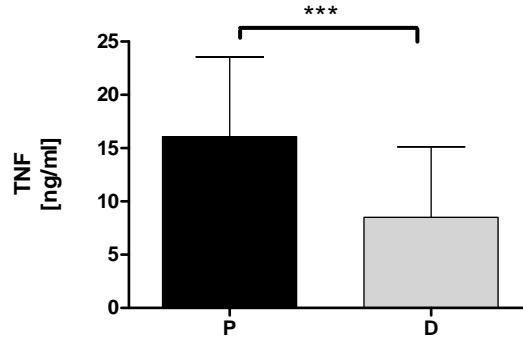


Figura 43.- Los pacientes presentan niveles sanguíneos mayores de TNF-a con respecto a los donadores. Gráfica de barras que muestra el promedio de las concentraciones de TNF α , en sangre periférica de pacientes (n=131) y donadores (n=90). Aplicando al prueba de Mann Whitney, se obtuvo un valor de $p < 0.001$, P respecto a D.

A pesar de observar una clara diferencia entre pacientes con AR y donadores, al evaluar la relación entre la actividad de la enfermedad (DAS28) y los niveles plasmáticos de TNF α no se encontró una correlación significativa (rho de Spearman: 0. -0.06094), como se muestra en la Figura 44A. Adicionalmente, se comparó los niveles de esta citocina en los tres subgrupos de pacientes con AR: sin actividad (< 2.6), baja actividad (> 2.6 y < 5.0) y alta actividad (> 5.0), y se obtuvo una p de Mann Whitney de 0.83, que sugiere que los tres grupos de pacientes presentan niveles similares de TNF-a (datos no mostrados).

Asimismo, tampoco observamos una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de IL-6 y el tiempo de evolución (rho=0.003, 44B), o el índice de masa corporal (rho=0.02935, 44C). Igualmente, se intentó estratificar los pacientes en base a las variables, pero tampoco se observó diferencia significativa. Conviene resaltar, que a semejanza de lo observado en leptina, a pesar de que el IMC fue similar entre donadores y pacientes con AR, el nivel de esta citocina fue significativamente mayor. De este análisis se podría concluir que ninguna de estas variables podría asociarse con los niveles de la citocina.

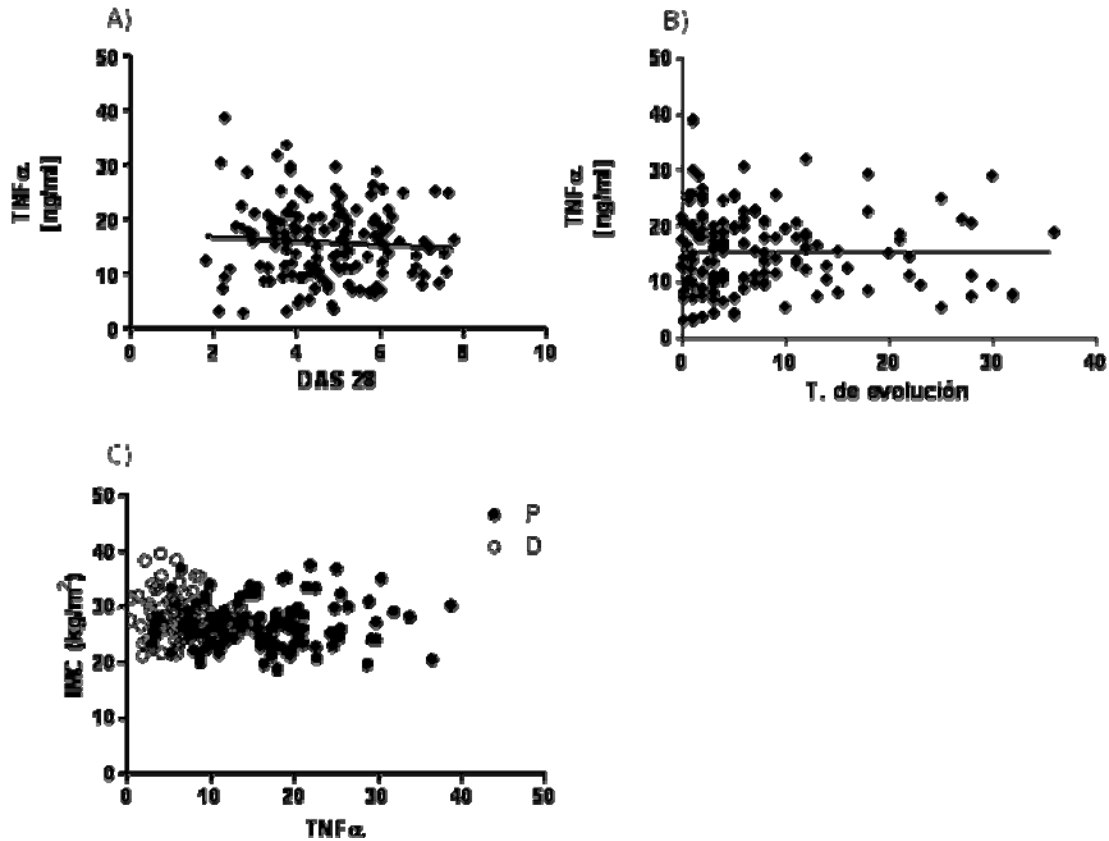


Figura 44. -Relación entre la actividad, el tiempo de evolución, el IMC A) Correlación entre la actividad (DAS28) y los niveles de TNF α (rho: -0.061, p: 0.4681), ; B) Correlación entre el tiempo de evolución de la población de pacientes y los niveles de TNF-a (rho: 0.002); C) Correlación entre el IMC de la población de pacientes y los niveles de TNF α , n para todos los casos de 131.

Por otro lado, al analizar la posible relación entre los títulos de autoanticuerpos (FR o aPCC) con los niveles de la citocina (ver Figura 45A y 45B), observamos una asociación estadística significativa pero baja para FR (rho Spearman= 0.24, p= 0.0030, ver Figura 45A) y para aPCC (rho=0.27, p= 0.0009, ver Figura 45B), cuando se evaluó la población completa de pacientes. Sin embargo, también observamos que los pacientes con niveles mayores de FR (>2000 U/ml) y de aPCC (>100 U/ml), presentaron niveles significativamente mayores de TNF- α , con respecto a los pacientes con niveles menores de FR (p=0.035) y de aPCC (p=0.008). Cuando se reevalúa la asociación de los niveles de esta citocina, sólo entre el subgrupo de pacientes con niveles altos de autoanticuerpos, los niveles de correlación se incrementan sensiblemente (ver Figuras 46A y 46B): para

pacientes con niveles superiores a 100 U/ml de FR, la rho de Spearman fue 0.3831, $p=0.0403$; para los pacientes con niveles superiores a 100 U/ml de aPCC, la rho fue de 0.311, con $p=0.0262$. Esto sugiere una asociación directamente proporcional entre los niveles mayores de esta citocina, con aquellos pacientes que presentan títulos elevados de autoanticuerpos.

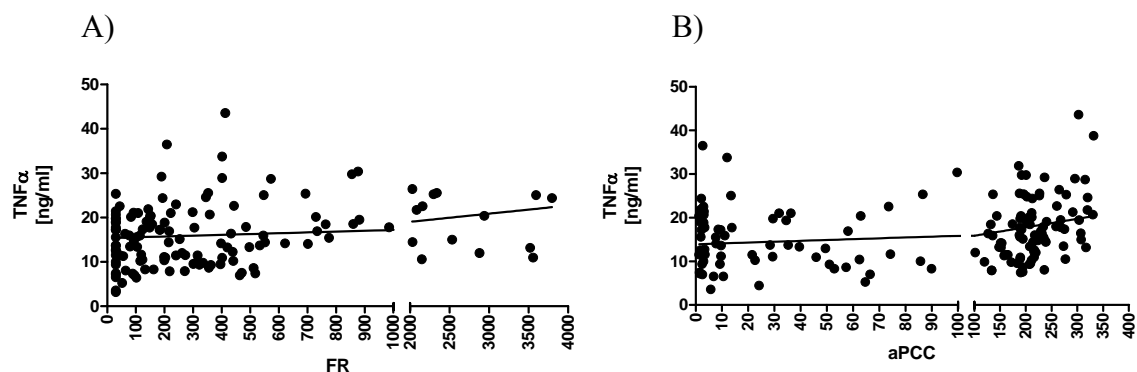


Figura 45.- Relación estadística entre los títulos de autoanticuerpos FR y aPCC con los niveles de TNF- α . Se muestran gráficas discontinuas, para los pacientes con niveles de FR < 1000 U/ml [$\rho=0.24$, A)] y menores a 100 U/ml de aPCC [$\rho=0.27$, B)]. La segunda parte de la gráfica muestra la correlación de Spearman para el grupo de pacientes con niveles elevados de autoanticuerpos, y muestra un aumento en la asociación: FR, $\rho=0.3831$ y aCCP, $\rho=0.3113$; para ambos casos $n=131$.

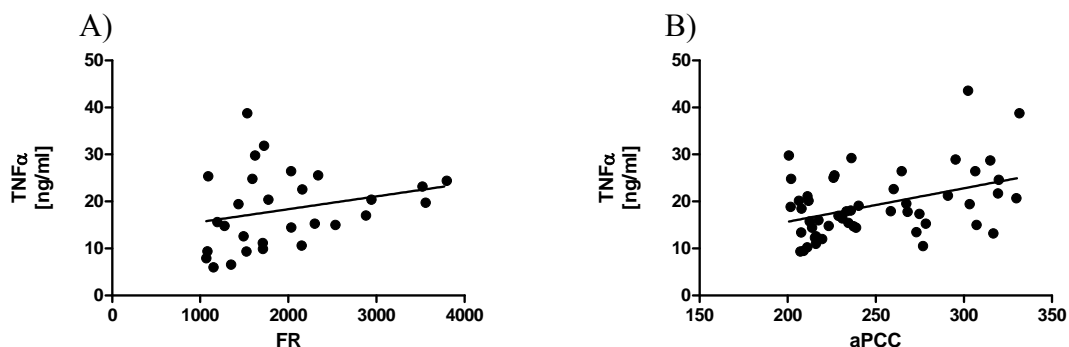


Figura 46.- Relación estadística entre los títulos de autoanticuerpos altos para FR (A) y aPCC (B) con los niveles de TNF- α . A) Se muestra gráfica, para los pacientes con niveles de FR > 1000 U/ml ($\rho=0.383$, $p=0.0403$), $n=28$. B) Se muestra gráfica para los pacientes con niveles mayores a 100 U/ml de aCCP ($\rho=0.3113$, $p=0.0262$), $n=33$.

APENDICE C (IL-17)

Para la determinación de los niveles plasmáticos de IL-17, se procedió a optimizar una curva patrón elaborada con la proteína IL-17 recombinante humana (Peprotech. Cat: 200-17 Lot: 03284), la cual nos serviría para la realizar la relación entre la concentración de la proteína con la densidad óptica. Esta relación presentó una pendiente de 0.005273 un valor de ordenada al origen de 0.1522. Con estos parámetros, y considerando el factor de dilución de la muestra a evaluar, se pudo determinar la concentración de IL-17 para las muestras de pacientes y donadores en unidades de ng/ml. Asimismo, esta curva patrón presentó un factor de correlación (r^2), que en caso de la curva de IL-17 fue de 0.8270, en el intervalo entre como se ve en la figura

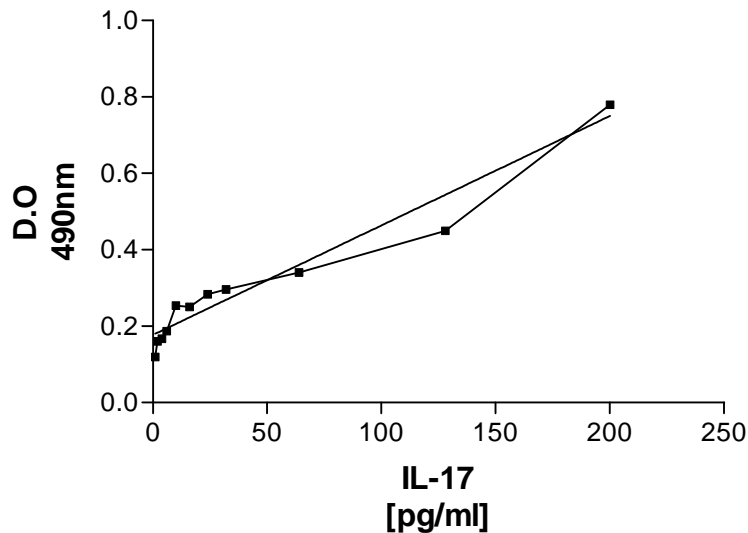


Figura 47. Curva patrón para IL-17. Se cuantificó la concentración de IL-17 por elaboración de una curva patrón a diferentes concentraciones y empleando IL-17 humana recombinante, n=3.

En el estudio de la presencia de la IL-17 se encontró que los niveles de esta proteína en suero son significativamente más elevados en pacientes con la enfermedad respecto a donadores, (pacientes 116.0 ± 4.268 y donadores 35.43 ± 2.013) corroborada con una prueba de Mann Whitney $p < 0.0001$.

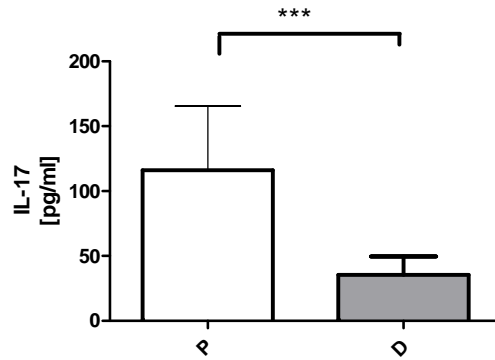


Figura 48.- Niveles de IL-17 en plasma encontrado entre pacientes con AR y donadores. A) Gráfica de puntos donde se muestran los niveles diferentes encontrados entre donadores (D) n=90, y pacientes con la enfermedad (P) n=131, $p < 0.0001$.

A pesar de observar una clara diferencia entre pacientes con AR y donadores, al evaluar la relación entre la actividad de la enfermedad (DAS28) y los niveles plasmáticos de IL-17 no se encontró una correlación significativa (rho de Spearman: 0.1330) como se muestra en la Figura 49A. Adicionalmente, se comparó los niveles de esta citocina en los tres subgrupos de pacientes con AR: sin actividad (< 2.6), baja actividad (> 2.6 y < 5.0) y alta actividad (> 5.0), y se obtuvo una p de Mann Whitney de 0.0422, que sugiere que el grupo de pacientes presentan con niveles más altos encuentra una mejor asociación con IL-17(ver Figura 49B)

Tampoco observamos una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de IL-6 y el tiempo de evolución (rho=0.07375, $p= 0.3865$, ver Figura 50A). Sin embargo, al hacer la clasificación en subgrupos existió una relación significativa entre el grupo T (pacientes con menos de un año con la enfermedad), donde los niveles de la citocina fueron más altos respecto a los pacientes del grupo con más de 20 años con la enfermedad (L) $p: 0.0284$ como se observa en la Figura 50B ($p: 0.0422$).

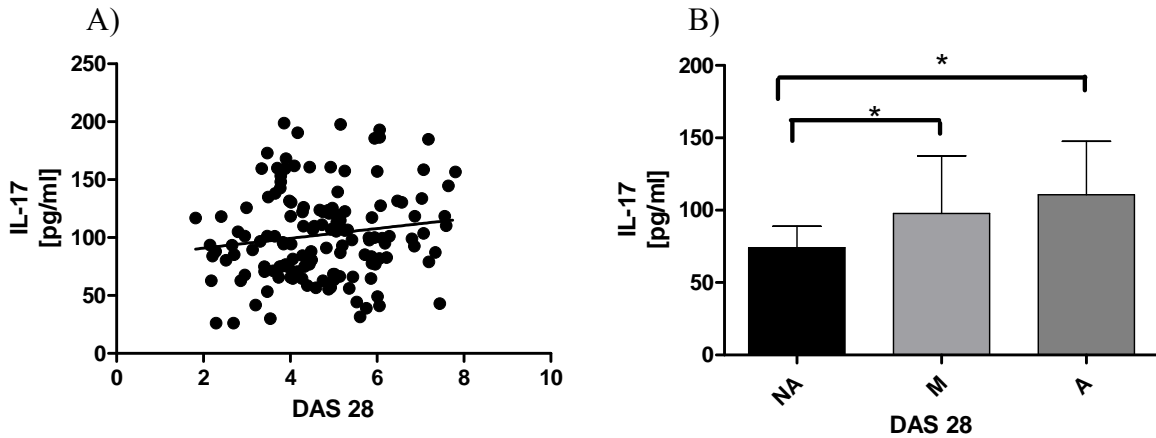


Figura 49.- Relación entre el nivel de IL-17 plasmática y el grado de actividad. A) Correlación entre IL-17 y pacientes con AR correlación no significativa, ($\rho = 0.1330$, $p: 0.1160$), $n=131$. B) Se muestra el promedio de las concentraciones de leptina de los grupos de pacientes con AR, los cuales se estratificaron en base a su nivel de actividad clínica: no activos (NA), $n=8$; actividad media (M) $n=76$; y actividad alta (A), $n=60$; ($p: 0.0422$, para el grupo M respecto a A; $p: 0.0480$, para el grupo A respecto a NA).

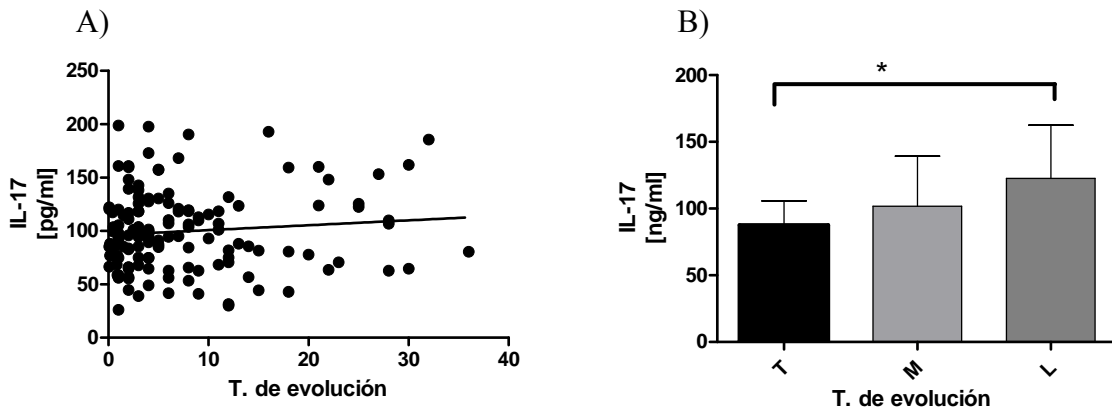


Figura 50.- Relación entre el tiempo de evolución, los niveles de IL-17 y la estratificación de los diferentes grupos A) Correlación entre el tiempo de evolución del total de la población de pacientes y los niveles de IL-17 ($r: 0.07375$, $p: 0.3865$). B) Estratificación de los diferentes tiempos de evolución de los pacientes y los niveles de IL-17; T pacientes con menos de un año con la enfermedad $n= 11$, M pacientes entre 1 y 20 años $n=65$ y L pacientes con más de 20 años con la enfermedad $n=55$, $p: 0.0144$ para el grupo L respecto a T.

Tampoco observamos una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de IL-17 y el índice de masa corporal ($\rho = 0.06644$, ver Figura 51A). Conviene resaltar, que a pesar de que el IMC fue similar entre donadores y pacientes con AR, el nivel de esta citocina fue significativamente mayor esto podría sugerir que el aumento de esta adipocitocina está relacionada más bien con la inflamación crónica. Al analizar la relación entre los niveles de IL-17 y los títulos de autoanticuerpos FR y aPCC no observamos

ninguna asociación estadística ($\rho = R: 0.06409$, $\rho 0.1359$ respectivamente, datos no mostrados para FR ver Figura 51B) Adicionalmente, al estratificar la población de pacientes en base a los niveles del FR y aPCC (B, bajo, M, medio y A, alto) no pudimos observar una diferencia significativa entre los grupos para FR no así para aPCC, en donde observamos la existencia de una asociación estadística entre los niveles de adiponectina y FR sobretodo en los pacientes con niveles elevados de FR ($p = 0.0263$) (datos no mostrados).

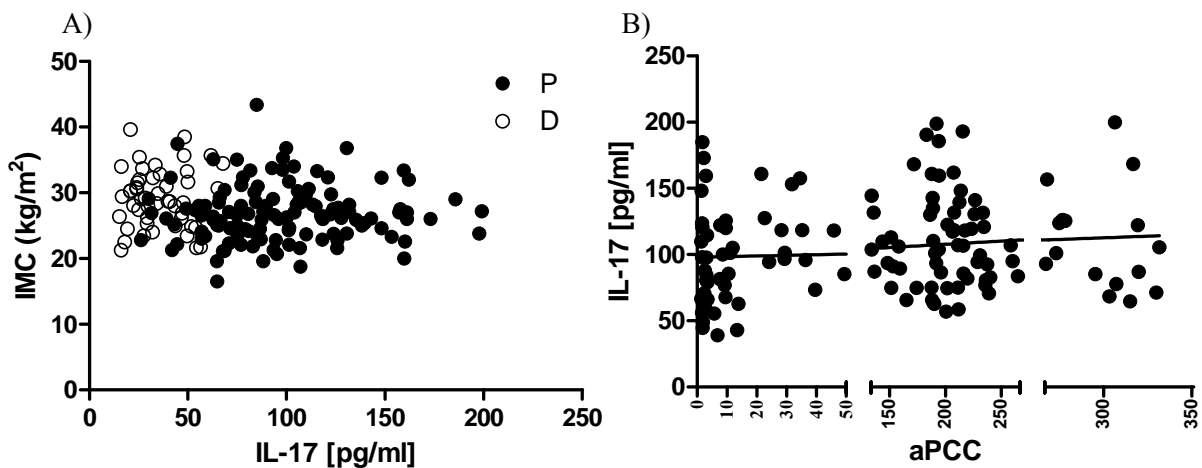


Figura 51.- Relación entre IMC y Título de anticuerpos. A) Correlación entre IMC y los niveles de IL-17($\rho: 0.06644$); Los círculos llenos corresponden a los pacientes (P), $n=90$ y los círculos vacíos corresponden a los donadores (D) $n=131$. B) Correlación entre títulos de aPCC y los niveles de IL-17($\rho: 0.1018$, $p: 0.1359$), $n=131$.

APENDICE D

Two-year follow-up of plasma leptin and other cytokines in patients with rheumatoid arthritis

Leptin is an adipocyte-derived hormone that may regulate the immune response.¹ Its reduction is associated with increased susceptibility to infection, whereas the opposite is associated with proinflammatory cytokine production in rheumatoid arthritis (RA) and other autoimmune disorders.² Leptin could represent a link between the immune response, metabolic functions and nutritional status.³

While the concentration of leptin may be increased in the plasma of patients with RA, in the synovial fluid it seems to be decreased.^{2,3} Although some reports found no difference between leptin plasma concentrations in patients with RA and healthy controls,⁴ we found it increased in RA, particularly in those patients with longer disease duration.⁵ Leptin concentration also correlated with disease activity measured by the 28-joint count Disease Activity Score (DAS28). Since leptin concentrations continue to increase when other cytokines (eg, tumour necrosis factor α (TNF α)) have reached a plateau, it has been proposed that leptin has a role in maintaining long-term inflammatory activity.⁶

We studied non-fasting serum samples from 19 patients with RA (18 women; mean age 45 \pm 11.6 years, mean body mass index (BMI) 27.8 \pm 4.8; mean disease duration 9 \pm 8 years; mean DAS28 4.5 \pm 2.3) treated for the previous 19 months with stable doses of methotrexate 10–20 mg/week, chloroquine 150 mg/day and prednisone \leq 10 mg/day, but no biological agents. We performed triplicate ELISAs of serum to determine the levels of leptin, adiponectin, TNF α and interleukin (IL)17 at baseline and 2 years later. Statistical differences were evaluated by the Wilcoxon signed rank test and correlation by Spearman analysis.

The mean difference ratios between baseline and the 2-year measurements were 1.14 \pm 0.54 for DAS28 ($p=0.28$), 1.17 \pm 0.42 for leptin ($p=0.62$), 2.52 \pm 1.85 for adiponectin ($p<0.01$), 2.47 \pm 1.3 for TNF α ($p<0.01$) and 2.43 \pm 1.2 for IL17 ($p<0.01$). The BMI remained stable during follow-up. There was a significant correlation between changes in DAS28 and leptin ($r_s=0.59$, $p=0.008$), and between leptin and IL17 ($r_s=0.49$, $p=0.02$). Increases in leptin paralleled increases in DAS28 (figure 1A), and changes in IL17 (figure 1B). Anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibodies did not correlate with leptin or IL17, yet two groups of patients, one with low and another with high anti-CCP antibodies titres, showed different correlations with DAS28 and IL17 (data not shown).

In comparison with other biomarkers—which correlate with pathogenesis and joint damage—used for diagnostic and prognostic purposes in RA,⁷ leptin seems to be related to long-term disease activity and may also have a role in regulating tissue-specific immune responses mediated by cytokines such as IL17. Although our study included only a small group of patients, we believe our findings could be confirmed in larger groups, despite several studies failing to show any relation between leptin levels and RA disease activity.^{7–9} We conclude that it is possible that leptin levels change in direct relation to disease progression and in close relation to changes in IL17 titres over time. Further studies are warranted to examine the role of leptin as a disease activity biomarker in patients with RA.

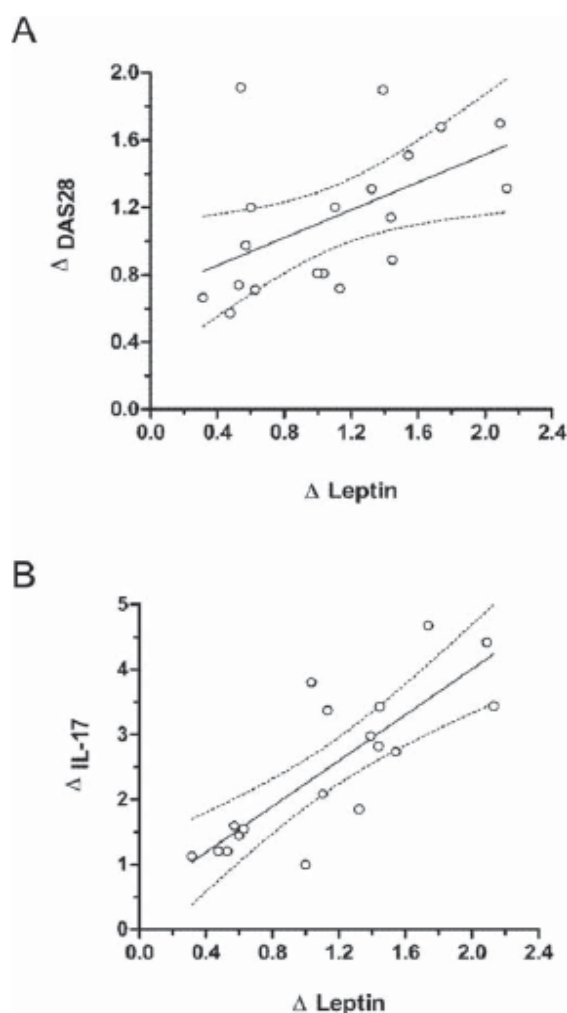


Figure 1 Correlation between (A) changes in 28-joint count Disease Activity Score (DAS28) and leptin ($p=0.008$; $r_s=0.59$) over time and (B) changes in interleukin (IL)17 and leptin over time ($p=0.02$; $r_s=0.49$). Δ refers to the mean ratio in the DAS28 score between baseline and at 2 years, the mean change in the plasma concentrations of leptin between baseline and at 2 years, and the mean change in the plasma concentrations of IL17.

D Xibillé-Friedmann,¹ C Bustos-Bahena,² S Hernández-Góngora,¹ R Burgos-Vargas,³ J L Montiel-Hernández²

¹Department of Rheumatology, Hospital General de Cuernavaca "Dr José G Parres", SSA, Cuernavaca, Morelos, México; ²Cytokine and Autoimmunity Laboratory, Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México; ³Department of Rheumatology, Hospital General de México, SSA, México City, México

Correspondence to: Dr José Luis Montiel-Hernández, Facultad de Farmacia, UAEM, Av Universidad 1001, Col Chamilpa, C.P. 62209, Cuernavaca, Morelos, México; jmontiel@uaem.mx

Competing interests None.

Ethics approval Ethics approval was obtained.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

Patient consent Obtained.

Accepted 27 June 2009.

Ann Rheum Dis 2009;XX:XX–XX. doi:10.1136/ard.2009.111732

REFERENCES

1. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 2004;4:371–9.
2. Otero M, Lago R, Gomez R, et al. Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1198–201.
3. Bokarewa M, Bokarewa D, Hultgren O, et al. Leptin consumption in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:952–6.
4. Popa C, Netea MG, Radstake TR, et al. Markers of inflammation are negatively correlated with serum leptin in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1195–8.
5. Xibille D, Gonzalez-Rivera J, Alvarez-Fuentes M, et al. Relationship between leptin and other proinflammatory cytokines on the course of disease activity of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66(Suppl III):342.
6. Targonska-Stepniak B, Majdan M, Dryglewska M. Leptin serum levels in rheumatoid arthritis patients: relation to disease duration and activity. *Rheumatol Int* 2008;28:585–91.
7. Harle P, Pongratz G, Weidler C, et al. Possible role of leptin in hypoandrogenicity in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004;63:809–16.
8. Hizmetli S, Kisa M, Gokalp N, et al. Are plasma and synovial fluid leptin levels correlated with disease activity in rheumatoid arthritis? *Rheumatol Int* 2007;27:335–8.
9. Harle P, Sarzi-Puttini P, Cutolo M, et al. No change of serum levels of leptin and adiponectin during anti-tumour necrosis factor antibody treatment with adalimumab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:970–1.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, L., Pober (1999). "Inmunologia celular y molecular."
- Alamanos, Y., P. V. Voulgari, et al. (2006). "Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review." *Semin Arthritis Rheum* 36(3): 182-188.
- Albani, S. and J. Roudier (1992). "Molecular basis for the association between HLA DR4 and rheumatoid arthritis. From the shared epitope hypothesis to a peptidic model of rheumatoid arthritis." *Clin Biochem* 25(3): 209-212.
- Aleffi, S., I. Petrai, et al. (2005). "Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells." *Hepatology* 42(6): 1339-1348.
- Alm, A. S., K. Li, et al. (2010). "Varying susceptibility of pulmonary cytokine production to lipopolysaccharide in mice." *Cytokine* 49(3): 256-263.
- Arita, Y., S. Kihara, et al. (1999). "Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity." *Biochem Biophys Res Commun* 257(1): 79-83.
- Axelsson, J., O. Heimbürger, et al. (2005). "Adipose tissue and its relation to inflammation: the role of adipokines." *J Ren Nutr* 15(1): 131-136.
- Batra, A., M. Zeitz, et al. (2005). "[The role of leptin in the immune system--a linking of endocrinology and immunology]." *Dtsch Med Wochenschr* 130(5): 226-229.
- Bays, H., L. Mandarino, et al. (2004). "Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach." *J Clin Endocrinol Metab* 89(2): 463-478.
- Beyaert, R., K. Schulze-Osthoff, et al. (1991). "Lithium chloride potentiates tumor necrosis factor-induced and interleukin 1-induced cytokine and cytokine receptor expression." *Cytokine* 3(4): 284-291.
- Bingham, C. O., 3rd (2002). "The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation." *J Rheumatol Suppl* 65: 3-9.
- Bokarewa, M., D. Bokarew, et al. (2003). "Leptin consumption in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* 62(10): 952-956.
- Bokarewa, M., I. Nagaev, et al. (2005). "Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties." *J Immunol* 174(9): 5789-5795.
- Canete, J. D., S. E. Martinez, et al. (2000). "Differential Th1/Th2 cytokine patterns in chronic arthritis: interferon gamma is highly expressed in synovium of rheumatoid arthritis compared with seronegative spondyloarthropathies." *Ann Rheum Dis* 59(4): 263-268.
- Cardiel, M. H. and J. Rojas-Serrano (2002). "Community based study to estimate prevalence, burden of illness and help seeking behavior in rheumatic diseases in Mexico City. A COPCORD study." *Clin Exp Rheumatol* 20(5): 617-624.
- Casanueva, F. F. and C. Dieguez (1999). "Growth Hormone Secretagogues: Physiological Role and Clinical Utility." *Trends Endocrinol Metab* 10(1): 30-38.
- Cha S, C. C., Han TU, Kang CP, Kang C, Bae SC. (2007). "Association of anti-cyclic citrullinated peptide antibody levels with PADI4 haplotypes in early rheumatoid arthritis and with shared epitope alleles in very late rheumatoid arthritis " *Arthritis Rheum* 56: 1454-1463.
- Chen, M., Y. Li, et al. (2008). "ADMA induces monocyte adhesion via activation of chemokine receptors in cultured THP-1 cells." *Cytokine* 43(2): 149-159.

- Chen, T. H., L. Chen, et al. (2006). "Evidence for a protective role for adiponectin in osteoarthritis." *Biochim Biophys Acta* 1762(8): 711-718.
- Choy, E. H. and G. S. Panayi (2001). "Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis." *N Engl J Med* 344(12): 907-916.
- Clegg, D. O. and J. R. Ward (1987). "Diagnostic criteria in rheumatoid arthritis." *Scand J Rheumatol Suppl* 65: 3-11.
- Comuzzie, A. G., T. Funahashi, et al. (2001). "The genetic basis of plasma variation in adiponectin, a global endophenotype for obesity and the metabolic syndrome." *J Clin Endocrinol Metab* 86(9): 4321-4325.
- Corl, F. M., M. R. Garland, et al. (2002). "A five-step approach to digital image manipulation for the radiologist." *Radiographics* 22(4): 981-992.
- Correa, T. G., Citera G (2004). "Anticuerpos anti-CCP en artritis reumatoidea: relación con características clínicas, citocinas Th1/Th2 y HLA-DRB1." *Biomedica*: 140.152.
- Del Rincon, I. and A. Escalante (1999). "HLA-DRB1 alleles associated with susceptibility or resistance to rheumatoid arthritis, articular deformities, and disability in Mexican Americans." *Arthritis Rheum* 42(7): 1329-1338.
- Deleuran, B. W., C. Q. Chu, et al. (1992). "Localization of tumor necrosis factor receptors in the synovial tissue and cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. Implications for local actions of tumor necrosis factor alpha." *Arthritis Rheum* 35(10): 1170-1178.
- Diez, J. J. and P. Iglesias (2003). "The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease." *Eur J Endocrinol* 148(3): 293-300.
- Dusserre, E., P. Moulin, et al. (2000). "Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues." *Biochim Biophys Acta* 1500(1): 88-96.
- Fabris, M., E. Di Poi, et al. (2002). "[TNF- alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNF-alpha agents: preliminary results]." *Reumatismo* 54(1): 19-26.
- Faggioni, R., J. Jones-Carson, et al. (2000). "Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(5): 2367-2372.
- Fantuzzi, G. (2005). "Adipose tissue, adipokines, and inflammation." *J Allergy Clin Immunol* 115(5): 911-919; quiz 920.
- Fausto Sánchez-Muñoz, Rebeca García-Macedo, Francisco Alarcón-Aguilar, y Miguel Cruz (2005). "Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune " *Gaceta Medica Mexico* 141(6): 505-515.
- Feldmann, M. (2001). "Gene therapy for rheumatoid arthritis?" *J Clin Invest* 107(11): 1353.
- Feldmann, M. (2001). "Pathogenesis of arthritis: recent research progress." *Nat Immunol* 2(9): 771-773.
- Feldmann, M., F. Brennan, et al. (2001). "Analysis of cytokine expression in rheumatoid synovium has provided new insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis and new therapeutic opportunities." *Transplant Proc* 33(3): 2085-2086.
- Feldmann, M., F. M. Brennan, et al. (2001). "The role of TNF alpha and IL-1 in rheumatoid arthritis." *Curr Dir Autoimmun* 3: 188-199.
- Feldmann, M. and R. N. Maini (1999). "The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Rheumatology (Oxford)* 38 Suppl 2: 3-7.

- Feldmann, M. and R. N. Maini (2001). "Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned?" *Annu Rev Immunol* 19: 163-196.
- Fried, S. K., D. A. Bunkin, et al. (1998). "Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid." *J Clin Endocrinol Metab* 83(3): 847-850.
- Fruhbeck, G., J. Gomez-Ambrosi, et al. (2001). "The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280(6): E827-847.
- Fujita, Y., M. Murakami, et al. (2002). "Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes." *Clin Exp Immunol* 128(1): 21-26.
- Gainsford, T. et al. (1996) "Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells." *Proc. Natl Acad. Sci.* 93: 14564-14568
- Garland, B. and P. W. Glimcher (2006). "Cognitive neuroscience and the law." *Curr Opin Neurobiol* 16(2): 130-134.
- Goldstein, B. J. and R. Scalia (2004). "Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function." *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): 2563-2568.
- Gomez (2005). "Anticuerposanti-PCC: nuevos autoanticuepos en la artritis reumatoide." *Revista Española de Reumatología* 32.
- González, J. (2007). "Correlación entre los niveles de la Adipocitocina Leptina y el grado de actividad de Artritis Reumatoide humana." Tesis para obtener el Título en Licenciatura en Farmacia.
- Gourraud, P. A., P. Dieude, et al. (2007). "A new classification of HLA-DRB1 alleles differentiates predisposing and protective alleles for autoantibody production in rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* 9(2): R27.
- Guzik, T. J., D. Mangalat, et al. (2006). "Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function?" *J Physiol Pharmacol* 57(4): 505-528.
- Haringman, J. J. and P. P. Tak (2004). "Chemokine blockade: a new era in the treatment of rheumatoid arthritis?" *Arthritis Res Ther* 6(3): 93-97.
- Haugen, F. and C. A. Drevon (2007). "Activation of nuclear factor-kappaB by high molecular weight and globular adiponectin." *Endocrinology* 148(11): 5478-5486.
- Hegyi, K., K. Fulop, et al. (2004). "Leptin-induced signal transduction pathways." *Cell Biol Int* 28(3): 159-169.
- Hill, J. A., S. Southwood, et al. (2003). "Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule." *J Immunol* 171(2): 538-541.
- Hirano, T., K. Yasukawa, et al. (1986). "Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin." *Nature* 324(6092): 73-76.
- Hoffman, R. W., F. X. O'Sullivan, et al. (1997). "Mycoplasma infection and rheumatoid arthritis: analysis of their relationship using immunoblotting and an ultrasensitive polymerase chain reaction detection method." *Arthritis Rheum* 40(7): 1219-1228.
- Hoffman, I. E., I. Peene, et al. (2005). "Diagnostic performance and predictive value of rheumatoid factor, anti-citrullinated peptide antibodies, and the HLA shared epitope for diagnosis of rheumatoid arthritis." *Clin Chem* 51(1): 261-263.

- Hosoda, H., M. Kojima, et al. (2003). "Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing." *J Biol Chem* 278(1): 64-70.
- Hovdenes, J., T. K. Kvien, et al. (1990). "IL-6 in synovial fluids, plasma and supernatants from cultured cells of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides." *Scand J Rheumatol* 19(3): 177-182.
- Hsing, C. H., H. H. Li, et al. (2008). "The distribution of interleukin-19 in healthy and neoplastic tissue." *Cytokine* 44(2): 221-228.
- Hu, W. L., S. B. Qiao, et al. (2007). "Decreased C-reactive protein-induced resistin production in human monocytes by simvastatin." *Cytokine* 40(3): 201-206.
- Hyun-Mi Choi, Y.-A. L., Sang-Hoon Lee, Seung-Jae Hong, Dae-Hyun Hahm, Sang-Yun Choi, Hyung-In Yang, Myung Chul Yoo and Kyoung Soo Kim (2009). "Adiponectin may contribute to synovitis and joint destruction in rheumatoid arthritis by stimulating vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-1, and matrix metalloproteinase-13 expression in fibroblast-like synoviocytes more than proinflammatory mediators." *Arthritis Research & Therapy* 11(6).
- Janeway C, T. P., Walport M, Shlomchik (2005). "Immunobiology: The Immune System in Health and Disease." Garland Science Publishing.
- Kamoun, M. (2005). "Diagnostic performance and predictive value of anti-citrullinated peptide antibodies for diagnosis of rheumatoid arthritis: toward more accurate detection?" *Clin Chem* 51(1): 12-13.
- Kanda, H., S. Tateya, et al. (2006). "MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity." *J Clin Invest* 116(6): 1494-1505.
- Kaser, S., A. Kaser, et al. (2003). "Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* 309(2): 286-290.
- Kawahata, K. (2009). "[Historical review of rheumatology and future directions]." *Nippon Rinsho* 67(3): 445-457.
- Klareskog, L., L. Padyukov, et al. (2007). "Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases." *Curr Opin Rheumatol* 19(1): 49-54.
- Klareskog, L., P. Stolt, et al. (2006). "A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination." *Arthritis Rheum* 54(1): 38-46.
- Kong, Y. Y., U. Feige, et al. (1999). "Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand." *Nature* 402(6759): 304-309.
- Kotake, S., N. Udagawa, et al. (1999). "IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis." *J Clin Invest* 103(9): 1345-1352.
- Kremer, J. (2005). "Is the outcome of rheumatoid arthritis changed with the use of new disease-modifying antirheumatic drugs?" *Arthritis Rheum* 53(5): 636-638.
- Kroot, E. J., B. A. de Jong, et al. (2000). "The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 43(8): 1831-1835.
- Lee, D. M. and P. H. Schur (2003). "Clinical utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic diseases." *Ann Rheum Dis* 62(9): 870-874.

- Lee H, I. P., Kern M, Lee A, Batliwalla F, Khalili H, et al. (2007). "Interaction between smoking, the shared epitope, and anti-cyclic citrullinated peptide: a mixed picture in three large North American rheumatoid arthritis cohorts." *Arthritis Rheum* 56: 1745–1753.
- Lee, S. W., J. H. Kim, et al. (2008). "Adiponectin mitigates the severity of arthritis in mice with collagen-induced arthritis." *Scand J Rheumatol* 37(4): 260-268.
- Lehrke, M., M. P. Reilly, et al. (2004). "An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans." *PLoS Med* 1(2): e45.
- Li, H. and X. Lin (2008). "Positive and negative signaling components involved in TNF α -induced NF- κ B activation." *Cytokine* 41(1): 1-8.
- Li, J., H. Nara, et al. (2010). "Impaired IL-7 signaling may explain a case of atypical JAK3-SCID." *Cytokine* 49(2): 221-228.
- Li, J. J., S. P. Nie, et al. (2009). "Chronic inflammatory status in patients with coronary artery ectasia." *Cytokine* 46(1): 61-64.
- Li, L., G. Yang, et al. (2009). "The adipose triglyceride lipase, adiponectin and visfatin are downregulated by tumor necrosis factor- α (TNF- α) in vivo." *Cytokine* 45(1): 12-19.
- Li, X. (2008). "Act1 modulates autoimmunity through its dual functions in CD40L/BAFF and IL-17 signaling." *Cytokine* 41(2): 105-113.
- Li, X., S. Jiang, et al. (2010). "Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival." *Cytokine* 49(1): 1-9.
- Li, Z. D., Y. Wu, et al. (2009). "Identification and characterization of human ARIP2 and its relation to breast cancer." *Cytokine* 46(2): 251-259.
- Liboni, K., N. Li, et al. (2004). "Mechanism of glutamine-mediated amelioration of lipopolysaccharide-induced IL-8 production in Caco-2 cells." *Cytokine* 26(2): 57-65.
- Lisignoli, G., S. Toneguzzi, et al. (2002). "Different chemokines are expressed in human arthritic bone biopsies: IFN- γ and IL-6 differently modulate IL-8, MCP-1 and rantes production by arthritic osteoblasts." *Cytokine* 20(5): 231-238.
- Liu, L., P. Yang, et al. (2008). "Leptin increases in Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) disease and promotes cell proliferation and inflammatory cytokine secretion." *Br J Ophthalmol* 92(4): 557-561.
- Lord, G. (2002). "Role of leptin in immunology." *Nutr Rev* 60(10 Pt 2): S35-38; discussion S68-84, 85-37.
- Lord, G. M., G. Matarese, et al. (1998). "Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression." *Nature* 394(6696): 897-901.
- Lu, J., H. Sun, et al. (2005). "Interleukin-12 p40 promoter activity is regulated by the reversible acetylation mediated by HDAC1 and p300." *Cytokine* 31(1): 46-51.
- Lubberts, E. and W. B. van den Berg (2003). "Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis." *Adv Exp Med Biol* 520: 194-202.
- Makrygiannakis, D., E. af Klint, et al. (2006). "Citrullination is an inflammation-dependent process." *Ann Rheum Dis* 65(9): 1219-1222.
- Malfait, A. M., R. O. Williams, et al. (2001). "Chronic relapsing homologous collagen-induced arthritis in DBA/1 mice as a model for testing disease-modifying and remission-inducing therapies." *Arthritis Rheum* 44(5): 1215-1224.
- Martin-Romero, C., J. Santos-Alvarez, et al. (2000). "Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes." *Cell Immunol* 199(1): 15-24.

- Matarese, G., S. Moschos, et al. (2005). "Leptin in immunology." *J Immunol* 174(6): 3137-3142.
- Matsui, T., K. Shimada, et al. (2006). "Diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies for very early rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* 33(12): 2390-2397.
- Mattioli, B., E. Straface, et al. (2005). "Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming." *J Immunol* 174(11): 6820-6828.
- McInnes, I. B. and G. Schett (2007). "Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Nat Rev Immunol* 7(6): 429-442.
- McTernan, C. L., P. G. McTernan, et al. (2002). "Resistin, central obesity, and type 2 diabetes." *Lancet* 359(9300): 46-47.
- Menard, H. A., E. Lapointe, et al. (2000). "Insights into rheumatoid arthritis derived from the Sa immune system." *Arthritis Res* 2(6): 429-432.
- Michou, L., S. Lasbleiz, et al. (2007). "Linkage proof for PTPN22, a rheumatoid arthritis susceptibility gene and a human autoimmunity gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(5): 1649-1654.
- Migita, K., Y. Maeda, et al. (2006). "The serum levels of resistin in rheumatoid arthritis patients." *Clin Exp Rheumatol* 24(6): 698-701.
- Mock, B. A., R. P. Nordan, et al. (1989). "The murine Il-6 gene maps to the proximal region of chromosome 5." *J Immunol* 142(4): 1372-1376.
- Mora, S. and J. E. Pessin (2002). "An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking." *Diabetes Metab Res Rev* 18(5): 345-356.
- Nakashima, K., M. Narazaki, et al. (1997). "Overlapping and distinct signals through leptin receptor (OB-R) and a closely related cytokine signal transducer, gp130." *FEBS Lett* 401(1): 49-52.
- Nawata, Y., E. M. Eugui, et al. (1989). "IL-6 is the principal factor produced by synovia of patients with rheumatoid arthritis that induces B-lymphocytes to secrete immunoglobulins." *Ann N Y Acad Sci* 557: 230-238, discussion 239.
- Nell, V. P., K. P. Machold, et al. (2005). "Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* 64(12): 1731-1736.
- Otero, M., R. Lago, et al. (2006). "Towards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin." *Rheumatology (Oxford)* 45(8): 944-950.
- Otero, M., R. Lago, et al. (2006). "Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* 65(9): 1198-1201.
- Otero, M., R. Lago, et al. (2006). "Leptin: a metabolic hormone that functions like a proinflammatory adipokine." *Drug News Perspect* 19(1): 21-26.
- Otero, M., R. Lago, et al. (2005). "Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights." *FEBS Lett* 579(2): 295-301.
- Ouchi, N., S. Kihara, et al. (1999). "Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin." *Circulation* 100(25): 2473-2476.
- Ouchi, N., S. Kihara, et al. (2001). "Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages." *Circulation* 103(8): 1057-1063.

- Ounissi-Benkalha, H., J. P. Pelletier, et al. (1996). "In vitro effects of 2 antirheumatic drugs on the synthesis and expression of proinflammatory cytokines in synovial membranes from patients with rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* 23(1): 16-23.
- Pan, Y. X., L. Gao, et al. (2007). "Exercise training prevents arterial baroreflex dysfunction in rats treated with central angiotensin II." *Hypertension* 49(3): 519-527.
- Park KG, P. K., Kim MJ, Kim HS, Suh YS, Ahn JD, et al. (1999). "Paradoxical decrease of an adipocyte specific protein, adiponectin, in obesity." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 257: 79-83.
- Patel, J. V., H. S. Lim, et al. (2009). "Circulating levels of adiponectin, leptin, and tumour necrosis factor alpha in hypertension." *Ann Med* 41(4): 291-300.
- Paula A. Correa , G. J. T., Gustavo Citera , José Cadena , Emilce Schneeberger , José F. Camargo , José A. Maldonado-Cocco , Juan Manuel Anaya (2004). "Anticuerpos anti-CCP en artritis reumatoidea: relación con características clínicas, citocinas Th1/Th2 y HLA-DRB1." 24: 140-152.
- Pickens, S. R., M. V. Volin, et al. (2010). "IL-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis." *J Immunol* 184(6): 3233-3241.
- Pool, A. J. and J. S. Axford (2001). "The effects of exercise on the hormonal and immune systems in rheumatoid arthritis." *Rheumatology (Oxford)* 40(6): 610-614.
- Popa, C., M. G. Netea, et al. (2005). "Markers of inflammation are negatively correlated with serum leptin in rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* 64(8): 1195-1198.
- Riminucci, M., S. A. Kuznetsov, et al. (2003). "Osteoclastogenesis in fibrous dysplasia of bone: in situ and in vitro analysis of IL-6 expression." *Bone* 33(3): 434-442.
- Ringwood, L. and L. Li (2008). "The involvement of the interleukin-1 receptor-associated kinases (IRAKs) in cellular signaling networks controlling inflammation." *Cytokine* 42(1): 1-7.
- Ruiz Benito , A. P. S. (2001). "¿Por qué un tratamiento precoz en la artritis reumatoide?" *MEDIFAM* 11: 335-341.
- Safaya, S., E. S. Klings, et al. (2009). "Effect of sodium butyrate on lung vascular TNFSF15 (TL1A) expression: differential expression patterns in pulmonary artery and microvascular endothelial cells." *Cytokine* 46(1): 72-78.
- Sailhamer, E. A., Y. Li, et al. (2010). "Hypoxic "second hit" in leukocytes from trauma patients: Modulation of the immune response by histone deacetylase inhibition." *Cytokine* 49(3): 303-311.
- Sánchez-Muñoz F, G.-M. R., Alarcón-Aguilar F, Cruza M (2005). "Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune." *Gaceta Medica Mexico* 141(6): 505-511.
- Schellekens, G. A., B. A. de Jong, et al. (1998). "Citruiline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies." *J Clin Invest* 101(1): 273-281.
- Scherer, P. E., S. Williams, et al. (1995). "A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes." *J Biol Chem* 270(45): 26746-26749.
- Schett, G., K. Redlich, et al. (1998). "Enhanced expression of heat shock protein 70 (hsp70) and heat shock factor 1 (HSF1) activation in rheumatoid arthritis synovial tissue. Differential regulation of hsp70 expression and hsf1 activation in synovial fibroblasts by proinflammatory cytokines, shear stress, and antiinflammatory drugs." *J Clin Invest* 102(2): 302-311.

- Schwartz, M. W., R. L. Prigeon, et al. (1997). "Evidence that plasma leptin and insulin levels are associated with body adiposity via different mechanisms." *Diabetes Care* 20(9): 1476-1481.
- Sebbag, M., M. Simon, et al. (1995). "The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies." *J Clin Invest* 95(6): 2672-2679.
- Senolt, L., D. Housa, et al. (2007). "Resistin in rheumatoid arthritis synovial tissue, synovial fluid and serum." *Ann Rheum Dis* 66(4): 458-463.
- Senolt, L., K. Pavelka, et al. (2006). "Increased adiponectin is negatively linked to the local inflammatory process in patients with rheumatoid arthritis." *Cytokine* 35(5-6): 247-252.
- Serelis, J., M. D. Kontogianni, et al. (2008). "Effect of anti-TNF treatment on body composition and serum adiponectin levels of women with rheumatoid arthritis." *Clin Rheumatol* 27(6): 795-797.
- Shingu, M., Y. Nagai, et al. (1993). "The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells." *Clin Exp Immunol* 94(1): 145-149.
- Shoda, H. and K. Yamamoto (2007). "[Molecular pathogenesis of rheumatoid arthritis--the roles of synovial cells, immune cells, and pro-inflammatory cytokines]." *Nippon Rinsho* 65(7): 1164-1166.
- Si, H. F., X. Lv, et al. (2008). "Suppressive effect of leflunomide on rat hepatic stellate cell proliferation involves on PDGF-BB-elicited activation of three mitogen-activated protein kinases." *Cytokine* 42(1): 24-31.
- Silswal, N., A. K. Singh, et al. (2005). "Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway." *Biochem Biophys Res Commun* 334(4): 1092-1101.
- Steppan, C. M., S. T. Bailey, et al. (2001). "The hormone resistin links obesity to diabetes." *Nature* 409(6818): 307-312.
- Tan, W., F. Wang, et al. (2009). "High adiponectin and adiponectin receptor 1 expression in synovial fluids and synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis." *Semin Arthritis Rheum* 38(6): 420-427.
- Tanabe, O., S. Akira, et al. (1988). "Genomic structure of the murine IL-6 gene. High degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human." *J Immunol* 141(11): 3875-3881.
- Tang, C. H., Y. C. Chiu, et al. (2007). "Adiponectin enhances IL-6 production in human synovial fibroblast via an AdipoR1 receptor, AMPK, p38, and NF-kappa B pathway." *J Immunol* 179(8): 5483-5492.
- Targonska-Stepniak, B., M. Dryglewska, et al. (2010). "Adiponectin and leptin serum concentrations in patients with rheumatoid arthritis." *Rheumatol Int* 30(6): 731-737.
- Targonska-Stepniak, B., M. Majdan, et al. (2008). "Leptin serum levels in rheumatoid arthritis patients: relation to disease duration and activity." *Rheumatol Int* 28(6): 585-591.
- Tartaglia, L. A., M. Dembski, et al. (1995). "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." *Cell* 83(7): 1263-1271.
- Tasaka, S., N. Hasegawa, et al. (2010). "Elevated serum adiponectin level in patients with Mycobacterium avium-intracellulare complex pulmonary disease." *Respiration* 79(5): 383-387.

- Tian, Z., R. Sun, et al. (2002). "Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation." *Biochem Biophys Res Commun* 298(3): 297-302.
- Tilg, H. and A. R. Moschen (2006). "Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity." *Nat Rev Immunol* 6(10): 772-783.
- Van der Helm-van Mil, A. H., J. Z. Wesoly, et al. (2005). "Understanding the genetic contribution to rheumatoid arthritis." *Curr Opin Rheumatol* 17(3): 299-304.
- Van Snick, J. (1990). "Interleukin-6: an overview." *Annu Rev Immunol* 8: 253-278.
- Verma, S., S. H. Li, et al. (2003). "Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction." *Circulation* 108(6): 736-740.
- Villaseñor (2002). "El papel de la leptina en el desarrollo de la obesidad." *Rev Endocrinol Nutr* 10(3): 135-139.
- Vinasco, J., Y. Beraun, et al. (1997). "Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis." *Tissue Antigens* 49(1): 74-78.
- Volk, T., M. Hensel, et al. (2000). "Secretion of MCP-1 and IL-6 by cytokine stimulated production of reactive oxygen species in endothelial cells." *Mol Cell Biochem* 206(1-2): 105-112.
- Vossenaar, E. R., T. J. Smeets, et al. (2004). "The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue." *Arthritis Rheum* 50(11): 3485-3494.
- Voulgari, P. V., G. Kolios, et al. (1999). "Role of cytokines in the pathogenesis of anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis." *Clin Immunol* 92(2): 153-160.
- Wang, H., W. S. Chu, et al. (2002). "Human resistin gene: molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in Caucasians." *J Clin Endocrinol Metab* 87(6): 2520-2524.
- Wei, Y., A. T. Whaley-Connell, et al. (2009). "Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates vascular apoptosis and injury via rescuing protein kinase B activation." *Hypertension* 53(2): 158-165.
- Wellen, K. E. and G. S. Hotamisligil (2003). "Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue." *J Clin Invest* 112(12): 1785-1788.
- Welsing and V. G. A. PMJ, Swinkels HL, Kiemeneij L (2001). "The relationship between disease activity, joint destruction, and functional capacity over the course of rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 44(9): 2009-2017.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2003). "Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects." *Nature* 423(6941): 762-769.
- Yang, Y., Y. Xu, et al. (2009). "STAT3 induces muscle stem cell differentiation by interaction with myoD." *Cytokine* 46(1): 137-141.
- Zauli, D., S. Zucchini, et al. (2003). "Prevalence of rheumatoid arthritis." *Rheumatology (Oxford)* 42(5): 696-697; author reply 697.
- Zetoune, F. S., A. R. Murthy, et al. (2001). "A20 inhibits NF-kappa B activation downstream of multiple Map3 kinases and interacts with the I kappa B signalosome." *Cytokine* 15(6): 282-298.
- Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* 372(6505): 425-432.

- Zhu, L. J., X. Yang, et al. (2010). "Suppression of tumor necrosis factor receptor associated factor (TRAF)-2 attenuates the proinflammatory and proliferative effect of aggregated IgG on rat renal mesangial cells." *Cytokine* 49(2): 201-208.
- Zwerina, J., K. Redlich, et al. (2005). "Pathogenesis of rheumatoid arthritis: targeting cytokines." *Ann N Y Acad Sci* 1051: 716-729.