



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"

**“EFECTO DEL BLOQUEO DE LA CO-SEÑALIZACIÓN
CD80/CD86:CD28 SOBRE LA EXPRESIÓN DE LA
MOLECULA CD28 EN LINFOCITOS T CD4+
EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE
BAJO TRATAMIENTO CRÓNICO CON CTLA-4Ig
(ABATACEPT)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN REUMATOLOGÍA
PRESENTA:
DRA. MARÍA CECILIA RAMÍREZ ASSAD



ASESOR:
DR. LUIS MANUEL AMEZCUA GUERRA

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2011



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.

Agradecimientos

A Dios: por todas sus bendiciones.

A mi familia, a mis papás y hermano: por apoyarme siempre y acompañarme en mi vida y carrera.

A mis padrinos de carrera y especialidad: por ayudarme a lograr mi sueño.

A mis amigos: por su cariño incondicional.

A mis maestros: por ser una fuente inagotable de enseñanzas.

INDICE

I. Título	4
II. Antecedentes.....	5
III. Justificación.....	7
IV. Objetivo.....	8
V. Marco teórico.....	9
VI. Tipo de estudio.....	16
VII. Metodología.....	17
VIII. Resultados.....	21
IX. Discusión.....	23
X. Conclusiones.....	25
XI. Tablas.....	26
XII. Referencias.....	28

I. Título

Efecto del bloqueo de la co-señalización CD80/CD86:CD28 sobre la expresión de la molécula CD28 en linfocitos T CD4+ en pacientes con Artritis Reumatoide bajo tratamiento crónico con CTLA-4Ig (abatacept)

II. Antecedentes

La **artritis reumatoide (AR)** es una enfermedad que se caracteriza por inflamación y dolor de las articulaciones. Es simétrica, poliarticular y suele afectar principalmente articulaciones pequeñas como las metacarpofalángicas (MCF), interfalángicas proximales (IFP), carpos y metatarsofalángicas (MTF), pero también codos, hombros, coxofemorales, rodillas y tobillos. Se acompaña de otros datos como rigidez articular mayor a 30 minutos, e incluso síntomas constitucionales no específicos, como astenia, adinamia, hipertermia y pérdida de peso. (1)

Existen diversos marcadores séricos de inflamación para Artritis Reumatoide que nos permiten determinar la actividad de la enfermedad e incluso su gravedad. Dentro de los principales, contamos con los reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva (PCR) y la velocidad de sedimentación globular (VSG), así como con una gama de citocinas pro-inflamatorias como la interleucina-6 (IL-6), IL-1, factor de necrosis tumoral (TNF). Estos aumentan o disminuyen, es decir, fluctúan según la actividad de la artritis.

La patogénesis exacta de la AR no se encuentra determinada por completo, pero se sabe que el sistema inmune y la activación inapropiada del mismo, juegan un papel fundamental. Se involucran una gran variedad de células inmunitarias y citocinas, que a su vez activan fibroblastos, condrocitos y osteoclastos, así como producen metaloproteasas y otras moléculas que producen destrucción articular. (2)

Además, se encuentran ya desde hace varios años en investigación, los linfocitos **CD4+ CD28null** (nulo) los cuales se consideran marcadores de inmunosenescencia,

secundario al estímulo continuo de los Linfocitos T liberados en el timo. Estos linfocitos se han propuesto como predictores de AR progresiva y erosiva, siendo el motivo del presente estudio. (3)

III. Justificación

Las células T CD4+ se presentan en una gran variedad de las vías patogénicas de la Artritis Reumatoide (AR). La vía de co-estimulación mediada por CD28 es crítica para la activación de las células T. El abatacept (CTLA-4Ig) es un medicamento bloqueador de esta vía co-estimuladora, ya que evita la unión del CD28 a los receptores CD80/86.

Se ha encontrado un incremento de células T con ausencia de CD28 (CD28 null) en el envejecimiento normal y en enfermedades autoinmunes como la AR. Por esto, se ha postulado que las células CD4+CD28 null representan un grupo de linfocitos T con senescencia prematura y que juegan un papel importante en la etiopatogenia de la AR. Existen estudios recientes en pacientes con AR que sugieren una disminución de células CD4+CD28null posterior a 6 meses de tratamiento con abatacept. Sin embargo, la permanencia de este efecto a largo plazo está por determinarse.

Este estudio se efectuó para determinar si el abatacept (CTLA-4Ig) utilizado a largo plazo puede lograr una disminución persistente de las células T CD4+CD28null en pacientes con AR.

IV. Objetivos

Primario:

- Determinar si el abatacept (CTLA-4Ig) utilizado a largo plazo puede lograr una disminución persistente de las células T CD4+CD28null en pacientes con AR.

Secundarios:

- Comparar la expresión de la molécula CD28 en linfocitos T CD4+ de pacientes con AR tratados con Abatacept (CTLA-4Ig), versus pacientes con AR establecida tratados únicamente con fármacos modificadores de la enfermedad (FARMEs).
- Comparar la expresión de la molécula CD28 de los linfocitos T CD4+ de los pacientes con AR (con Abatacept ó sólo FARMEs) versus controles sanos.
- Identificar cambios en la concentración de citocinas prototípicas de la AR y de reactantes de fase aguda con respecto a la inhibición de la co-señalización CD80/CD86: CD28.

V. Marco Teórico

La **Artritis Reumatoide (AR)** es un padecimiento autoinmune inflamatorio, cuya patogénesis no ha sido esclarecida por completo. Se sabe que se debe a una compleja interacción entre alteraciones en el sistema inmunitario, activación de células (como fibroblastos, condrocitos y osteoclastos) y producción de sustancias que producen inflamación y finalmente destrucción articular. (2)

Múltiples **citocinas** se encuentran asociadas a la patogénesis de la AR, sin embargo, aunque en un inicio pueden presentarse las derivadas de la respuesta a los linfocitos Th2 (como IL-4), en una AR establecida existe el predominio de la respuesta **Th1**. Esta última está mediada por IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, interferón gama (IFN γ) y TNF. Progresivamente habrá mayor influencia de las citocinas pro-inflamatorias que se derivan de los sinoviocitos tipo A (semejantes a macrófagos): IL-1 β , IL-6 y TNF. Estos activan a los osteoclastos y promueven la producción de metaloproteasas responsables de la destrucción ósea y pérdida del cartílago articular. La IL-8 y otras citocinas quimioatrayentes reclutan neutrófilos. La IL-6 promueve la diferenciación de **linfocitos B** en células secretoras de anticuerpos y sus niveles se correlacionan con los de autoanticuerpos como el Factor Reumatoide (FR), como se verá más adelante. (4)

El conocimiento sobre la preferencia de producción de **linfocitos Th1** y su desbalance relativo contra los linfocitos Th2 permite una mejor aplicación de tratamientos, ya que se sabe que medicamentos como el metotrexato, la leflunomida y la sulfasalazina, entre otros, logran modular el equilibrio Th1/Th2. (5) Así mismo, los glucocorticoides

estimulan las citocinas Th2, lo que se traduce en retroalimentación negativa al grupo Th1. (6)

En cuanto al **TNF**, se ha reconocido su papel en la producción de inflamación articular en la AR, así como de osteoclastogénesis y la osteopenia yuxtaarticular secundaria. Sus principales efectos inflamatorios son mediados por moléculas de adhesión, citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6 e IL-8) y metaloproteasas. Por este motivo, se han desarrollado fármacos biológicos que bloquean su actividad (anti-TNF), o los que bloquean a las interleucinas producidas. (7)

Los **linfocitos B** secretan citocinas (IL-4 e IL-10) que activan a los linfocitos T, además, las inmunoglobulinas que producen tienen participación en la patología de la AR. El **Factor Reumatoide** es un autoanticuerpo que se encuentra dirigido contra la porción Fc de la inmunoglobulina G (IgG). Esta región es básica para la fijación del complemento por la vía clásica, por lo que se encontraría disminuido en el líquido sinovial en AR. El FR está dirigido en contra de IgG1 e IgG2 (en linfocitos de la sangre), y contra IgG3 en la membrana sinovial. Sin embargo, la detección del FR como prueba diagnóstica no es tan efectiva ya que se describe con una sensibilidad y una especificidad del 70%. (8)

La existencia de autoanticuerpos (inmunoglobulinas) que se unen a los péptidos citrulinados producidos en los pacientes con AR también tiene implicaciones diagnósticas. (9) Este anti-PCC (**anti péptido cíclico citrulinado**) se une a la filagrina citrulinada derivada de la arginina modificada por la enzima peptidil arginina desaminasa (PADI). Otros péptidos como la vimentina, el fibrinógeno y la fibronectina

también pueden ser modificados. Las isoenzimas PADI2 y PADI4 se encuentran en abundancia en el sinovio. Estos eventos no son exclusivos de la AR ya que ocurren en otras enfermedades inflamatorias, sin embargo, el anti-PCC se encuentra en 80-90% de los pacientes con AR, con una especificidad del 90% y tiene relación con un peor pronóstico. (10)

Las **células presentadoras de antígenos** (CPA), en particular las células dendríticas, son importantes ya que activan a los linfocitos T vírgenes. Aunque suelen localizarse en la epidermis y en el tracto gastrointestinal, se ha definido que también pueden ubicarse en la membrana sinovial. La contribución de las células dendríticas en la AR no está bien descrita aún. (11) Se sabe que las CPA son mediadores entre la respuesta inmune innata y la adaptativa; interactúan con los Linfocitos T para procesar antígenos y desencadenar respuestas inmunitarias. Tienen receptores de reconocimiento de patógenos, como los receptores tipo Toll (TLR), los cuales se expresan en el tejido sinovial en AR. Al reconocer **productos bacterianos y virales** estos receptores inducirían la activación de las células dendríticas, así como estimulación de los linfocitos T y convertir una auto-reactividad potencial (tolerancia) en una auto-reactividad manifiesta. (12)

La susceptibilidad a AR ha demostrado ser significativamente mayor en pacientes con **haplotipo DR4** del complejo principal de histocompatibilidad II (CMH II). Aquí se encuentra el llamado “**epítipo compartido**” – QKRAA o QRRAA- de la región hipervariable. Esta susceptibilidad para desarrollar AR se encuentra relacionada a la tercer región hipervariable (cadenas DR β , desde los aminoácidos 70 al 74). El epítipo presenta una secuencia de glutamina-leucina-arginina-alanina-alanina (QKRAA), que

se encuentra en los genes DR4 al DR14, donde la AR es más prevalente, así como algunas cadenas DR1 β y DR4 β . Las cadenas con mayor asociación a la AR son: DRB*0401, DRB*0404, DRB*0101 y DRB*1402. El epítotope QKRAA también puede predecir la severidad de la AR, ya que se encuentra más comúnmente en pacientes con manifestaciones extra-articulares. (13)

Los **Linfocitos T** están implicados en la patogénesis inflamatoria, osteoclastogénesis, y se encuentran presentes en la membrana sinovial. Además, la modulación de los linfocitos T por medio de tratamiento ha mostrado mejoría de la artritis, que sugiere su importante participación en la AR. Los linfocitos T que expresan el receptor clásico (TCR), que se encuentra conformado por cadenas alfa y beta, son los linfocitos CD4+ y CD8+. Los CD8+ son células efectoras que destruyen otras células que estén infectadas (citotóxicos). Los primeros, es decir, los linfocitos CD4+, sirven como reguladores de otras células del sistema inmune por medio de secreción de citocinas o por contacto célula-célula (por lo que se les llama “colaboradores” o Th –T helpers-). Dentro del grupo de CD4+ existen los llamados Linfocitos T reguladores (Treg) que expresan CD25 y son una pequeña subpoblación que suprime la respuesta de los linfocitos T. Los linfocitos Treg permiten conservar la tolerancia periférica a lo propio. La supresión de células T CD4+/CD25+ promueve enfermedad autoinmune sistémica. (14) Sin embargo, de forma paradójica se encuentra un incremento de estas células en las articulaciones inflamadas de pacientes con AR, pero su capacidad de suprimir a las citocinas pro-inflamatorias se encuentra disminuida. (15)

Los linfocitos T requieren al menos 2 **señales co-estimuladoras** para su activación. Uno de sus principales receptores co-estimuladores es **CD28**. Tiene 2 ligandos: B7-1

(CD80) y B7-2 (CD86) los cuales se expresan en las CPA (como células dendríticas), Linfocitos B y macrófagos activados. La interrupción de la unión CD28-B7 bloquea la función y activación de los linfocitos T, provocando que entren en un estado anérgico. Sin embargo, estos ligandos CD80 y CD86 también se encuentran presentes en los linfocitos T en AR, que sugiere un mecanismo patogénico auto-sostenido que perpetúa la activación de más linfocitos T. (16)

El segundo receptor **co-estimulador** principal es **CTLA-4 ó CD152** (antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico). Este receptor incrementa en los linfocitos T posterior a su activación (por la activación de CD28 y aumento de IL-2) y también interactúa con los ligandos CD80 y CD86. El CTLA-4 está constituido por una secuencia de aminoácidos, de la cual un tercio es idéntica a la de CD28, permitiéndole unirse a CD80 y CD86 de las CPA (igual que CD28) pero con una afinidad muy superior (x2500 y x570 veces respectivamente, a favor del CTLA-4). CTLA-4 tiene el objetivo de regular a la baja la actividad de los linfocitos T, por lo que se considera inhibitorio. (16, 17) Esto ha permitido el desarrollo de terapias como el **Abatacept** que es una proteína de fusión compuesta de una inmunoglobulina que se unirá a un dominio extracelular del CTLA-4, y promoverá la inhibición de la coestimulación de los linfocitos T. Actualmente se utiliza para AR, aunque muchos estudios han sido desarrollados en pacientes con respuesta inadecuada a los anti-TNF.

Todos estos mecanismos son atribuidos al desarrollo de Artritis Reumatoide. En los últimos años se han estudiado otros factores como la presencia de marcadores o subpoblaciones celulares que pudieran estar implicados en su patogénesis. Este es el caso del **CD28**, que se expresa de forma constitutiva por casi el 100% de los linfocitos

CD4+ y un 50% de los CD8+, en personas sanas. Las células T **CD28-**, son extremadamente raras en recién nacidos y van incrementando con la edad. (18) Se han encontrado desde hace ya más de 20 años células T con expresión defectuosa de su CD28 (CD4+CD28- y CD8+CD28-) en condiciones con alteraciones inmunológicas (como VIH, trasplantes de órganos, infecciones virales agudas) e incluso enfermedades autoinmunes como el Lupus Eritematoso Sistémico y la AR. (19)

Los **linfocitos T CD4+CD28- (ó CD28 null)** son una subpoblación celular con un alto potencial proinflamatorio y de daño tisular. Se clasifican como linfocitos CD4+ que cuentan con características semejantes a los linfocitos NK (citólíticos naturales) y que por lo tanto efectúan un “puente” entre la respuesta inmune innata y adaptativa. Algunas de estas son: respuesta a un antígeno específico, secreción abundante de IFN- γ , citotoxicidad mediada por perforinas y granzima B (capacidad para lisar células) e independencia de las vías coestimuladoras clásicas. (20) Además, la falla de vías apoptóticas como la de la proteína de supervivencia bcl-2, la cual no es regulada a la baja y en lugar de esto permanece en altos niveles en células CD28 deficientes, condicionando la supervivencia de estas células. Todos estos mecanismos pueden explicar tanto el daño efectuado, así como su aparente “resistencia” a muchos de los tratamientos para AR disponibles en la actualidad (21).

Existen estudios que confirman la expansión de CD4+ y ausencia de CD28 (nulo) en algunos pacientes con AR y se ha postulado que caracterizan a una AR agresiva, con manifestaciones extraarticulares y cambios ateroscleróticos tempranos. (19,22,23) El CD28 disminuye ante la presencia de TNF, por lo que se observa este grupo de linfocitos en el envejecimiento normal (por incremento de TNF en la tercera edad) –

células de senescencia-. (24) La presencia prematura de células T CD4+CD28null en menores de 40 años, se observa en enfermedades inflamatorias como AR, granulomatosis de Wegener y esclerosis múltiple, resultantes de activación inmune crónica (25). Tienen actividad proinflamatoria al producir IFN- γ (citocina prototipo de Th1) que se involucra en la patogénesis de la AR, como se mencionó previamente, e incluso en el desarrollo de aterosclerosis temprana (26). Estos hallazgos hablan de las importantes implicaciones clínicas y morbi-mortalidad secundaria a la presencia de los linfocitos T CD4+CD28null por lo que son el motivo de análisis en este estudio.

Investigaciones previas han sugerido que el tratamiento con medicamentos que bloquean las vías coestimuladoras (como el Abatacept a la vía del CTLA-4), evita la unión del CD28 y previene la activación de las células T. Se estima que así como existe regulación a la baja de la vía coestimuladora de CD28 al unirse a su ligando CD80/CD86, la unión del Abatacept (CTLA-4 Ig) a este ligando evitará además la generación de subpoblaciones CD28 null. (19)

Existen reportes que mencionan la utilidad del Abatacept incluso en AR refractaria previamente tratada con otros agentes biológicos (inhibidores de TNF) (27,28); así como la disminución progresiva de las poblaciones circulantes CD4+CD28- y CD8+CD28- posterior al tratamiento con Abatacept, siendo la primera subpoblación (CD4+CD28-) analizada en este estudio, a continuación.

VI. Tipo de estudio

Estudio de corte transversal, observacional y comparativo en pacientes con AR establecida y de larga evolución.

VII. Metodología

El grupo de estudio está compuesto por pacientes con AR bajo tratamiento >5 años con Abatacept (N~10). Se incluyó un grupo de pacientes con AR en tratamiento convencional con fármacos no biológicos modificadores de enfermedad, pareados por edad.

Población de estudio:

Las muestras fueron obtenidas en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INCICH) de México D.F., posterior al consentimiento informado por los pacientes.

Criterios de Inclusión:

Pacientes con AR documentados como seropositivos con FR+ y AntiPCC+ (anti péptido cíclico citrulinado), evidencia clínica y radiológica que apoya el diagnóstico, cumpliendo los criterios revisados del American College of Rheumatology. Se aceptaron ambos géneros, sin restricción de edades. La evaluación fue efectuada en todos los casos por un reumatólogo calificado y fueron reclutados en la consulta externa de Reumatología del INCICH.

Se dividieron en 2 grupos. El primer grupo de pacientes con AR en tratamiento con FARMEs y abatacept (grupo A). El segundo, pacientes con AR en tratamiento con FARME, sin biológicos (grupo B). Se incluyó un tercer grupo de controles sanos (grupo C).

Criterios de Exclusión:

Pacientes que se negaran a participar. Quienes no cumplieran con los criterios de la ACR para AR o que tengan otra enfermedad autoinmune asociada (excepto Sjögren secundario). Pacientes con infecciones recientes, eventos quirúrgicos, traumáticos o de otra índole (independientes a su padecimiento) que pudieran alterar de forma adversa los resultados y reactantes de fase aguda.

Metodología:

Las características demográficas y clínicas (incluyendo los criterios de clasificación del American College of Rheumatology) se obtuvieron en la primera visita, previa aceptación y firma del consentimiento de informado. En cada visita se determinó el grado de actividad clinimétrica mediante el instrumento DAS-28 de tres ítems incluyendo PCR. Se obtendrán 12 cc de sangre periférica por punción antecubital.

Técnica para identificación de biomarcadores por expresión génica: a partir de 4 cc de sangre periférica se extrajeron el RNA total según protocolos convencionales, con posterior transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real empleando diseños previamente validados (Coef. Var. <10%) basados en la utilización de sondas de hidrólisis de DNA.

Secuencias génicas: NFKB1 (NM_001165412) left ACCCTGACCTTGCCTATTT right
AGCTCTTTTTCCCGATCTCC; TNF (NM_000594) left CAGCCTCTTCTCCTTCCTGA
right GCCAGAGGGCTGATTAGAGA; GAPDH (NM_002046) left
AGCCACATCGCTCAGACAC right GCCCAATACGACCAAATCC.

Técnica para citometría de flujo: a partir de 8 cc de sangre periférica se analizó la presencia aislada o simultánea de las moléculas CD4 y CD28 en las células mononucleares mediante marcaje con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD28 los cuales estarán así mismo acoplados a los fluorocromos PE y APC respectivamente.

Técnica para citocinas: a partir del suero restante de los procesos previos, se realizó la determinación de citocinas mediante técnicas convencionales de inmunoensayos enzimáticos.

Técnica para PCR: a partir del suero restante de los procesos previos, se determinó la concentración de proteína C reactiva mediante inmunonefelometría de alta sensibilidad.

Análisis estadístico:

Por las características de la población de estudio y el tipo no Gaussiano de distribución de las variables, se utilizó estadístico no paramétrica.

Estadística descriptiva: se realizó mediante frecuencias simples y proporciones para variables dicotómicas, mientras que se utilizaron medianas e intervalos intercuartilares para otras variables.

Estadística inferencial: las variables dicotómicas se compararon mediante prueba de chi cuadrada, mientras que para las variables ordinales se utilizó la prueba de Wilcoxon (Wilcoxon's signed rank test) para observaciones pareadas. La asociación entre variables se determinará mediante coeficiente rho de Spearman con intervalos de confianza al 95%.

Todos los análisis se realizarán a dos colas, fijando un valor de significancia estadística en $p < 0.05$. Los datos se compilarán en bases de datos en el programa Excel y los análisis se realizarán con el programa estadístico GraphPad prism versión 4.02

VIII. Resultados

Se incluyeron a un total de 17 pacientes con AR y 10 individuos sanos. La distribución por grupos se generó de la siguiente manera:

- **Grupo A (Abatacept):** 9 pacientes (9/9 mujeres= 100%), con una mediana de edad de 58 años (37-69 años) y una mediana de 14 años de duración de su enfermedad (11-31 años). El 100% de estos pacientes utilizan actualmente Metotrexato (MTX) dosis media de 22.5mg/sem (7.5-25mg/sem), 33% hidroxicloroquina, 55% prednisona a dosis bajas. Todo este grupo se encontró en tratamiento con Abatacept 500mg/mes IV por una media de 7 años.
 - o DAS 28 (PCR 3 elementos)- mediana 3.65 (2.1- 5.5)
- **Grupo B (FARMEs, sin biológicos):** 8 pacientes (6/8 mujeres= 75%), con mediana de edad de 62 años (35-72 años) y mediana de duración de su enfermedad de 6.5 años (3-38 años). El 100% utiliza MTX como FARME principal a dosis de 15mg/sem (7.5-20 mg/sem), 87.5% utilizan hidroxicloroquina, y 50% prednisona a dosis bajas.
 - o DAS 28 (PCR 3 elementos)- mediana 3.58 (1.9-4.7)
- **Grupo C (Controles sanos):** Controles para citometría de flujo. 10 participantes (7/10 mujeres= 70%), con edad promedio 31 años (28-37 años). No utilizan medicamento alguno. No se midió DAS 28.

El grupo A (abatacept) fue similar al grupo B (FARMEs) en el índice DAS28 (3.6, 2.1-5.5 vs 3.5, 1.9-4.7). Los niveles de IFN γ (0 vs 0), IL-17 (0 vs 0), IL-1 β (50, 0-462 vs 30,

18-277 pg/mL) e IL-6 (173, 1-705 vs 92, 0-449 pg/mL) fueron similares entre ambos grupos (A vs B).

De la misma forma, la tasa de expresión de RNAm de TNF/GAPDH (15, 5.4-30 vs 20, 10-30) y de NF- κ B/GAPDH (165, 90-250 vs 120, 100-160) entre ambos grupos de pacientes con AR, sin importar su tratamiento.

El porcentaje de células T CD4⁺CD28^{null}/CD4⁺ fue similar entre ambos grupos con Artritis Reumatoide (3.9%, 1-16.3 vs 6.7%, 1.5-25.5) comparado con el grupo de controles (6%, 1.7-25). Sin embargo, al analizar las gráficas de la citometría de flujo fue clara la presencia de células T CD4⁺ CD28^{null} con una expresión más alta de CD4⁺ (región R4 de las figuras) en pacientes con AR, sin importar el tratamiento que utilizaran, y claramente ausentes en el grupo control. El porcentaje de células CD4^{high}CD28^{null}/CD4⁺ totales fue similar entre los grupos de AR con abatacept (0.77%, 0.1-4) y pacientes con FARMES (2.4%, 0.01-21.2; p>0.05), pero diferente comparado con el grupo control (0%, 0-0; p<0.01 para ambas comparaciones). El porcentaje de células T CD4^{high}CD28^{null}/CD4⁺CD28^{null} mostró resultados semejantes (44%, 2.9-82.2 vs 41.2%, 1-83.9 vs 0%, 0-0; p<0.01, para ambos grupos de AR contra controles, respectivamente).

IX. Discusión

Se efectuaron comparaciones entre los grupos A=Abatacept y B= sólo FARMES. El grupo C=Controles se utilizó como control para la citometría de flujo.

Los grupos A y B presentan afinidad en cuanto a sus características, siendo grupos comparables entre sí, con una mediana de edad del grupo A de 58 años (rango 37-69 años), y 62 años en el grupo B (rango 35-72 años) ($P>0.05$). Encontramos que ambos grupos de pacientes con AR, a pesar de tener diferente manejo (como el grupo A=Abatacept, con utilización de un biológico por más de 7 años) utilizan actualmente un promedio igual de FARMES (grupo A= 2.5 incluyendo Abatacept / grupo B= 2.5 medicamentos). Incluso el uso de Metotrexato (MTX) en ambos grupos era del 100% de sus pacientes, mientras que de Prednisona a dosis bajas era del 55% en el grupo A, y del 50% en el grupo B. La única diferencia significativa entre ambos fue la menor utilización de hidroxicloroquina en el grupo A (sólo el 33%), comparado con el B (87.5%) ($P = 0.049$).

Según los antecedentes mencionados se permite suponer que los pacientes del grupo A, que son pacientes con utilización crónica de biológicos (CTLA-4Ig) por más de 7 años, presentarían diferencia importante en cuanto a su evolución clínica, por lo que efectuamos dentro de su valoración DAS28 de 3 elementos con PCR (proteína C reactiva). Nuestros resultados muestran que la PCR del grupo A tuvo una mediana de 10.4 mg/L (0.8-116) y del grupo B 3.5mg/L (0.7-14) ($p=0.13$). Sin embargo, al obtener el DAS28-PCR, el grupo A obtuvo una calificación media de 3.65 (2,1-5.5) y el B de 3.5 (1.9-4.7), por lo que se concluye que ambos grupos se comportaron de forma

semejante a pesar de sus diferencias en tratamiento ($p = 0.8$). Esto aplica igualmente en las citocinas estudiadas.

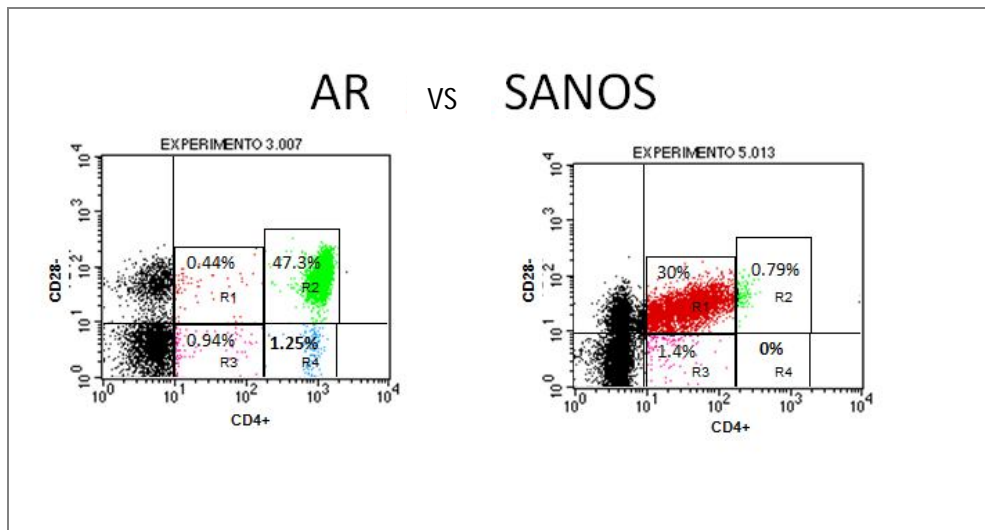
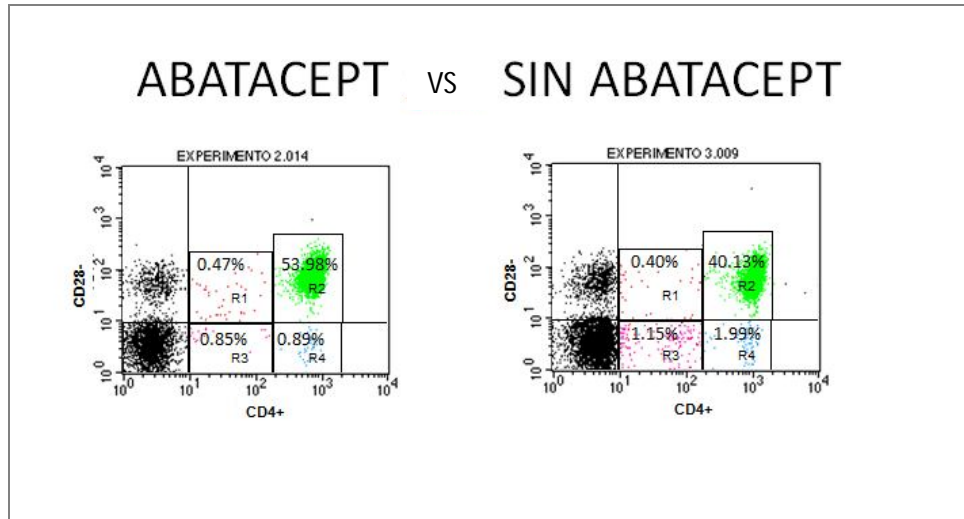
En cuanto a las citometrías de flujo, se esperaba ver un decremento de células T CD4+CD28null (positivización del CD28) en los pacientes con AR en tratamiento con abatacept, por lo que el número total de estas células debería ser significativamente menor en el grupo de abatacept, comparado con el de FARMEs. Además, se esperaba fueran inexistentes en el grupo control. Como se mencionó, las gráficas de plots de la citometría de flujo mostraron una persistencia relativa de las células CD4+CD28null en ambos grupos de AR sin importar el tratamiento. Sin embargo, si se tomaba en cuenta el grado de expresión del CD4 (bajo=low vs alto=high), se demostró que el subtipo de CD4+low (de baja expresión) disminuyó de forma importante con abatacept y FARMEs, pero no el subtipo CD4+high (de alta expresión). Este hecho explicaría el por qué estudios previos no han logrado una recuperación total (positivización) de las células T CD4+CD28null posterior a tratamientos con biológicos, ya que las células CD4+high/CD28null aparentemente no son afectadas por ninguno de los dos tratamientos (abatacept o FARMEs). Es importante destacar que en ninguno de los controles se encuentran las células CD28null, por lo que se podrían utilizar más adelante como marcadores secundarios relacionados al diagnóstico de dicha patología e incluso como predictores de presencia o ausencia de actividad.

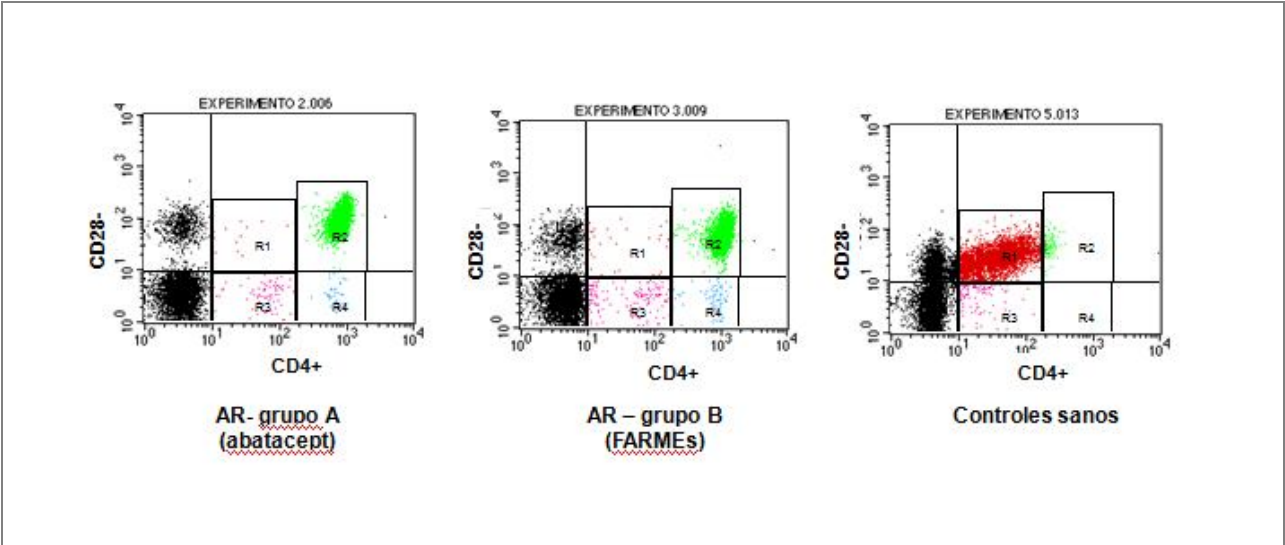
X. Conclusiones

Los tratamientos de Artritis Reumatoide como los utilizados en este estudio (abatacept y FARMES convencionales) se encuentran asociados a una disminución de los niveles de citocinas prototípicas Th1, Th17 y de inmunidad innata. Además, se relacionan con la disminución de la cantidad de células T CD4+CD28null, que son Linfocitos T de senescencia temprana que sólo se presentan en envejecimiento y enfermedades autoinmunes, como sucede en la Artritis Reumatoide (no en controles jóvenes sanos).

Sin embargo, existe un subtipo de células CD28null con expresión alta de CD4+ (CD4+high) que permanece elevado en AR, sin importar el tratamiento efectuado. El papel de este subtipo de células T no ha sido elucidado aún, pero pudieran servir como marcadores de la enfermedad de forma secundaria, e incluso como monitorización de la actividad de la enfermedad.

XI. Tablas





XII. Fuentes

- 1) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24,
- 2) Smith JB, Haynes MK. Rheumatoid arthritis: a molecular understanding. *Ann Intern Med* 2002; 136: 908-22
- 3) Goronzy JJ, Matteson EL, Fulbright JW et al. Prognostic markers of radiographic progression in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 43-54.
- 4) Raza K, Falciani F, Curnow SJ et al. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: R784-95.
- 5) Dimitrova P, Shapenko A, Hermann ML, et al. Restriction of de novo pyrimidine biosynthesis inhibits Th1 cell activation and promotes Th2 cell differentiation. *J Immunol* 2002; 169: 3392-99.
- 6) Almawi WY, Melemedjian OK, Rieder MJ. An Alternate mechanism of glucocorticoid anti-proliferative effect: promotion of a Th2 cytokine-secreting profile. *Clin Transplant* 1999; 13: 365-74.
- 7) Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001; 344: 907-916.
- 8) Van Zeben D, Hazes JM, Zwinderman AH et al. Clinical significance of rheumatoid factors in early rheumatoid arthritis: results of a follow up study. *Ann Rheum Dis* 1992; 51: 1029-35.

- 9) Van Zeben D, Breedveld FC. Prognostic factors in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996; 44 (suppl): 31-33.
- 10) Silverman GJ, Carson DA. Roles of B cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2003; 5 (suppl 4): S1-S6.
- 11) Banchereau J, Briere F, Caux C et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
- 12) Seibl R, Birchler T, Loeliger S et al. Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 2003; 162: 1221-7.
- 13) Weyand CM, Goronzy JJ. T cell responses in rheumatoid arthritis: systemic abnormalities-local disease. *Curr Opin Rheumatol* 1999; 11: 210-17.
- 14) Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic selftolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 531-62.
- 15) Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* 2004; 200: 277-85.
- 16) Verwilghen J, Lovis R, DeBoer M et al. Expression of functional B7 and CTLA4 on rheumatoid synovial T cells. *J Immunol* 1994; 153: 1378-85.
- 17) Karandikar NJ, Vanderlugt CL, Walunas TL et al. CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med* 1996; 184: 783-88.
- 18) Azuma M, Phillips JH, Lanier LL. CD28- T lymphocytes. *J Immunol* 1993; 150: 1147-59.

- 19) Scarsi M, Ziglioli T, Airo P. Decreased circulating CD28-negative T Cells in patients with Rheumatoid Arthritis treated with Abatacept are correlated with clinical response. *J Rheum.* 2010; 37: 911-16.
- 20) Warrington KJ, Takemura S, Goronzy JJ, et al. CD4+ CD28- T cells in rheumatoid arthritis patients combine features of the innate and adaptative immune systems. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 13-20.
- 21) Schirmer M, Vallejo AN, Weyand C, Goronzy JJ. Resistance to apoptosis and elevated expression of Bcl-2 in clonally expanded CD4+CD28- T cells from rheumatoid arthritis patients. *J Immunol.* 1998; 161: 1018-25.
- 22) Schmidt D, Goronzy JJ, Weyand CM. CD4+CD7-CD28- T cells are expanded in rheumatoid arthritis and are characterized by autoreactivity. *J Clin Invest.* 1996; 97: 2027-37.
- 23) Martens PB, Goronzy JJ, Schaid D, et al. Expansion of unusual CD4+ T cells in severe rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1997; 40: 1106-14.
- 24) Effros RB, Boucher N, Porter V, et al. Decline in CD28+ T cells in centenarians and in long term T cells cultures: a possible cause for both in vivo and in vitro immunosenescence. *Exp Gerontol.* 1994; 29: 601-9.
- 25) Warrington KJ, Vallejo AN, Weyand CM, et al. CD28 loss in senescent CD4+ T cells: reversal by interleukin-12 stimulation. *Blood.* 2003; 101: 3543-49.
- 26) Gerli R, Schillaci G, Giordano A, et al. CD4+CD28- T Lymphocytes contribute to early atherosclerotic damage in rheumatoid arthritis patients. *Circulation.* 2004; 109: 2744-48.

- 27) Kremer JM, Westhovens R, Leon M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA-4Ig. *N Engl J Med.* 2003; 349: 1907-15
- 28) Genovese MC, Becker JC, Schiff M, et al. Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. *N Engl J Med.* 2005; 353: 1114-23.