



PERFIL DE EXPRESIÓN DE CASPASA-1 Y NLRP-3 COMO
COMPONENTES DEL INFLAMASOMA NALP3 EN PACIENTES CON
HIPERURICEMIA CRÓNICA, GOTA AGUDA Y GOTA INTERCRÍTICA

que para obtener el grado de

Especialista en Reumatología

presenta

Diana Laura Ferrusquía Toriz

Asesor de Tesis

Dr. Luis Manuel Amezcua Guerra

Agosto, 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

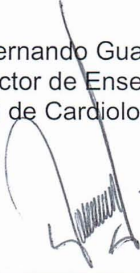
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

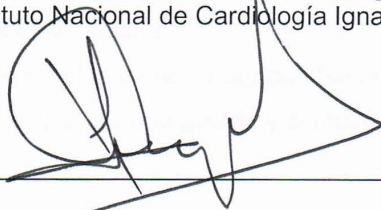
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Autorizaciones

Dr. José Fernando Guadalajara Boo
Director de Enseñanza
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez



Dr. Luis Manuel Amezcua Guerra
Asesor
Investigador en Ciencias Médicas "D"
Departamento de Inmunología
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez



Dr. Manuel Martínez-Lavin García-Lascurain
Vocal
Jefe del Departamento de Reumatología
Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez



Agradecimientos

A Dios, por ponerme en el lugar y en el momento justos.

A mis padres amados, David y Laura, por el ejemplo de esfuerzo y éxito, además de su apoyo y amor incondicional.

A mis hermanitos, Valerie y Pablo, por todas las muestras de cariño y los hermosos momentos de diversión.

A mi adorado esposo, Diego, por ser mi mejor impulso en cada proyecto, además de mi mejor amigo, mi socio, mi motivo diario...

A mis amigos, los de siempre y los de hoy, por acompañarme en este gran paso.

A mis maestros y asesores, que me han guiado y confiaron en mí.

ÍNDICE

Relación de tablas y figuras.....	5
Resumen.....	6
Abstract.....	7
1. Introducción.....	8
2. Antecedentes.....	9
3. Justificación.....	13
4. Objetivos.....	13
5. Hipótesis.....	14
6. Material y métodos	
6.1.Tipo de estudio.....	14
6.2.Ubicación temporal y espacial.....	14
6.3.Criterios de selección de la muestra.....	14
6.4. Definición de variables.....	16
6.5. Consideraciones éticas.....	16
6.6.Procedimiento.....	16
6.7.Análisis estadístico.....	18
7. Resultados.....	19
8. Discusión de resultados.....	20
9. Conclusiones.....	22
10. Anexos	
10.1.Formato de recolección de datos.....	23
10.2.Formato de Consentimiento informado.....	24
11.Referencias bibliográficas.....	25

RELACIÓN TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1. Criterios de clasificación para gota aguda, ACR 1977.....	15
TABLA 2. Variables estudiadas.....	16
TABLA 3. Características demográficas de los pacientes con gota aguda, gota intercrítica e hiperuricemia crónica.....	19
TABLA 4. Niveles de Caspasa-1 y NLRP-3 en los pacientes con gota aguda, gota intercrítica e hiperuricemia crónica.....	19
FIGURA 1. Mecanismos propuestos para la señalización intracelular a través de NLRP-3.....	12
FIGURA 2. Niveles de caspasa 1 (CASP1) y NLRP3 en los grupos de pacientes con gota aguda, gota intercrítica e hiperuricemia asintomática.....	20

RESUMEN

Título: PERFIL DE EXPRESIÓN DE CASPASA-1 Y NLRP-3 COMO COMPONENTES DEL INFLAMASOMA NALP3 EN PACIENTES CON HIPERURICEMIA CRÓNICA, GOTA AGUDA Y GOTA INTERCRÍTICA

Los mecanismos que subyacen a la inflamación aguda inducida por los cristales de urato monosódico (UMS) apenas se están comenzando a descifrar. En pacientes con hiperuricemia crónica sin manifestaciones musculoesqueléticas, a pesar de existir un estímulo nocivo intrarticular, la causa por la cual no se desencadena un evento agudo no se ha podido elucidar.

Objetivo: Describir en monocitos de sangre periférica los niveles de expresión de dos de los componentes del inflammasoma NALP3 (caspasa 1 y NLRP-3) en pacientes con diagnóstico de gota aguda, fase intercrítica de gota tofácea crónica e hiperuricemia asintomática.

Diseño: descriptivo, abierto, exploratorio, observacional y analítico, de corte transversal.

Métodos: Se realizó la separación de monocitos de sangre periférica empleando el reactivo para separación por gradiente HISTOPAQUE-1077 así como aislamiento de RNA, síntesis de cDNA y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Termociclador LightCycler 2.0) para medición de NLRP3, CASP-1 y GAPDH (este último como gen de referencia).

Resultados: Se estudiaron 74 pacientes captados entre mayo de 2012 y junio de 2013, 44 del Hospital General Dr. Manuel Gea González con hiperuricemia crónica y 26 en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, de los cuales 15 se encontraban en ataque agudo de gota y 11 en periodo intercrítico. No se encontraron diferencias en las medianas entre los tres grupos tanto en la medición de Caspasa-1 (0.00631 vs 0.00604 vs 0.00636, $p=0.81$) ni en NLRP-3 (0.003635 vs 0.00373 vs 0.00395, $p=0.55$).

Conclusiones: En este estudio no fue posible demostrar que los pacientes con gota aguda, gota intercrítica e hiperuricemia crónica cursan con niveles diferentes en caspasa-1 o NLRP-3.

Palabras clave: inflammasoma NALP3, gota aguda, gota intercrítica, hiperuricemia crónica

ABSTRACT

CASPASE-1 AND NLRP-3 AS NALP3 INFLAMMASOME COMPONENTS IN PATIENTS WITH ACUTE GOUT ATTACK, CHRONIC GOUT AND CHRONIC HYPERURICEMIA

The NALP3 inflammasome is an innate immunity complex underlying acute inflammation induced by monosodic urate crystals in acute gout. Most patients with chronic hyperuricemia do not develop acute attacks despite harboring crystals in their joints. The cause for the different clinical presentations is not known yet.

Objective: To describe the levels of expression of two of the NALP3 inflammasome complex (caspase-1 and NLRP-3) in peripheral blood monocytes in acute gout, chronic gout and chronic hyperuricemic patients.

Design: This is an observational, descriptive and analytic study. Participants were sampled once, at inclusion.

Methods: Monocytes in peripheral blood were separated using HISTOPAQUE-1077 for RNA extraction, cDNA synthesis and real-time polymerase chain reaction (Light Cycler 2.0) for the quantification of NLRP-3, CASP-1 and GAPDH (as a resident gene).

Results: Of 74 patients included between may 2012 and june 2013, 44 had chronic hyperuricemia, 15 were with acute gout attack and 11 had chronic gout. No differences were found among the three groups in the expression of Caspase-1 (0.00631 vs 0.00604 vs 0.00636, $p=0.81$) or NLRP-3 (0.003635 vs 0.00373 vs 0.00395, $p=0.55$).

Key words: NALP3 inflammasome, acute gout, chronic gout, chronic hyperuricemia

1. INTRODUCCIÓN

Aunque el agente causal de la gota se identificó hace más de un siglo, los mecanismos que subyacen a la inflamación aguda inducida por los cristales de urato monosódico (UMS) apenas se están comenzando a descifrar. La característica patológica de un ataque de gota es el gran infiltrado de neutrófilos en la membrana y el líquido sinovial articular; sin embargo, dado que los neutrófilos no están presentes dentro de la articulación normal, se cree que el primer evento patogénico es la interacción de los cristales de UMS con los sinoviocitos tipo A (células de linaje monocítico/macrofágico) del revestimiento articular, lo que desencadena la activación del endotelio y facilita la entrada de los neutrófilos.

La exposición de cristales de UMS a monocitos conduce a su fagocitosis y a la producción de citocinas proinflamatorias, en particular IL-1 β . Se ha demostrado que el inflamasoma NALP3 es un elemento crítico en la detección de los cristales de UMS y en la posterior activación de la inmunidad innata. Los macrófagos provenientes de ratones deficientes en diferentes componentes del inflamasoma (incluyendo la caspasa-1, ASC, y NLRP3) son incapaces de activar la IL-1 β en respuesta a la estimulación de cristales de UMS. Más aún, estos ratones también muestran gran alteración en la capacidad de infiltración tisular de los neutrófilos al reto de la inyección intraperitoneal de UMS, lo que posiciona al inflamasoma NALP3 como un vínculo fundamental entre el estímulo causal de la gota (presencia de UMS cristalizado) y las manifestaciones histopatológicas de un ataque articular agudo (influjo de cantidades masivas de neutrófilos), con las células del linaje monocítico/macrofágico como el posible modulador de este vínculo.

Actualmente se sabe que no todos los individuos con hiperuricemia desarrollan episodios de inflamación aguda a pesar de existir depósitos intracartilagosos de UMS. Es posible que la diferencia en la presentación clínica se deba a la activación diferencial de uno o más componentes del inflamasoma NALP3 en los pacientes con gota aguda y los que cursan con hiperuricemia asintomática. Dichas diferencias podrían tener influencia directa en la migración y activación de neutrófilos y células de la inmunidad innata al interior de la articulación involucrada.

2. ANTECEDENTES

El ácido úrico (AU) es el producto final del metabolismo de las purinas y su excreción permite la remoción de desechos nitrogenados del organismo. En los líquidos extracelulares, el 98% del AU se encuentra en forma de ion urato a pH de 7.4.¹ A diferencia de otros mamíferos que tienen niveles séricos de urato monosódico (UMS) por debajo de 2 mg/dL, los primates típicamente observan niveles entre 6 y 7 mg/dL. Esta discrepancia se explica por la presencia, en primates, de diversas mutaciones en el gen de la uricasa, enzima responsable de degradar el AU a alantoína, un catabolito hidrosoluble y fácil de excretar por vía renal.²

La hiperuricemia es una anomalía bioquímica definida en términos fisiológicos como cualquier nivel de UMS en suero por arriba de 6.8 mg/dL; en este punto se excede su límite de solubilidad e inicia la cristalización y potencial depósito tisular. La cristalización del UMS requiere de pH neutral y saturación tisular y parece ser dependiente del tiempo y la gravedad de la hiperuricemia. Ahora es claro que el depósito tisular de uratos, específicamente en la superficie del cartílago articular, ocurre antes del inicio clínico de la gota y un número significativo de individuos asintomáticos con hiperuricemia crónica presenta este depósito.³ El ultrasonido (US) ha mostrado ser una técnica de imagen válida para detectar el involucro musculoesquelético en pacientes con gota. Además de las erosiones óseas que se detectan tres veces más frecuentemente por esta técnica avanzada de imagen en comparación con la radiología simple, los depósitos de UMS pueden ser detectados por US en el cartílago articular.⁴ Esto ha sido definido como el “signo del doble contorno” y se describe cuando se detecta una línea fuertemente ecogénica paralela a la línea ecogénica normal del hueso cortical, con una línea anecoica intermedia que representa al cartílago.⁵

El signo de doble contorno se observa hasta en el 92% de las articulaciones con gota, mientras que se encuentra ausente en las articulaciones de individuos sanos.⁶ Está bien establecido que el signo del doble contorno puede encontrarse hasta en el 25% de individuos con hiperuricemia crónica sin historia clínica de involucro musculoesquelético, mientras que éste no se observó en ninguno de los individuos normouricémicos. Otros cambios estructurales sugestivos de gota (entesopatía y tofos intrarticulares) también fueron observados con mayor frecuencia en los individuos asintomáticos con hiperuricemia crónica.⁷ Más recientemente, de Miguel y colaboradores observaron el

signo del doble contorno en 11 de 26 (42%) individuos con hiperuricemia asintomática e identificaron cristales de UMS mediante microscopia de luz polarizada en el líquido sinovial de 9 de ellos, confirmando la presencia simultánea de UMS cristalizado y signo de doble contorno ecográfico en la misma articulación.⁸

La hiperuricemia es el principal factor de riesgo para desarrollar gota. El estudio "Normative Aging Study" evaluó la incidencia del primer episodio de artritis gotosa aguda en una cohorte prospectiva de 2,046 hombres sanos seguidos durante 14.9 años y demostró que la tasa de incidencia anual de gota es de 4.9% cuando la primera determinación de UMS sérico es ≥ 9 mg/dL; a diferencia, esta es de solo 0.5% para niveles de UMS entre 7 y 8.9 mg/dL, y de 0.1% para niveles basales por debajo de 7 mg/dL.⁹ A pesar de esto, la mayor parte de individuos con hiperuricemia jamás desarrollarán gota clínica. El estudio "National Health and Nutrition Examination Survey (NANHES)" mostró una prevalencia de hiperuricemia (definido en este estudio como UMS ≥ 7 mg/dL) de 21.1% en hombres y 4.7% en mujeres, mientras que la prevalencia de artritis gotosa fue de 5.9% y 2%, respectivamente.^{10,11} Así, no se han identificado factores que predigan de manera certera el desarrollo de gota en individuos con hiperuricemia crónica y, por ende, aquellos individuos asintomáticos que pudieran beneficiarse de la terapia hipouricemiante¹².

El depósito de UMS en las capas superficiales del cartílago articular parece ser un mecanismo más bien pasivo;¹³ diferentes componentes del cartílago incluyendo el condroitin-4-sulfato disminuyen la solubilidad del UMS y promueven la nucleación y crecimiento de los cristales.¹⁴ En clara diferencia, la presencia de cristales dentro de la articulación estimula una señal inflamatoria por dos vías interdependientes. Por un lado, la activación del complemento resulta en la generación de quimioatrayentes que activan y reclutan a los neutrófilos del torrente circulatorio; por otro lado, el ingreso de los neutrófilos a la cavidad sinovial es impedido por las células endoteliales, a menos que estas sean primero activadas por las citocinas generadas por los macrófagos que revisten a la membrana sinovial.²

Estudios recientes han proveído pistas sobre los mecanismos a través de los cuales los cristales de UMS pueden activar macrófagos, en particular el papel del inflamasoma NALP3. Los receptores tipo NOD (NLR, por sus siglas en inglés) son estructuras capaces de reconocer tanto patrones moleculares asociados a patógenos como moléculas

endógenas, incluyendo cristales de UMS. Los NLR están compuestos por tres dominios: un dominio sensor LRR C-terminal, un dominio de unión a nucleótidos (NOD) y un dominio N-terminal que regula las interacciones proteína-proteína. Los NLR responden a las señales de daño a través de la formación de inflammasomas, complejos poliprotéicos citoplásmicos que actúan como plataformas de activación de caspasas. Un inflammasoma típico está compuesto por un NLR, una proteína adaptadora asociada a partículas apoptóticas (ASC) y una caspasa efectora que activa citocinas proinflamatorias, en particular interleucina (IL)-1 β ¹⁵.

Se han identificado tres proteínas NLR capaces de formar inflammasomas: NLRP1, NLRP3 y NLRC4. La proteína NLRP3, o criopirina, forma el inflammasoma NALP3, el cual está involucrado en el reconocimiento de numerosos ligandos exógenos y endógenos, incluyendo a los cristales de urato monosódico. Hasta el momento hay procesos intracelulares que no han podido ser esclarecidos como el papel de las especies reactivas de oxígeno o los diferentes pasos que llevan a la activación del inflammasoma¹⁶. En el caso de los cristales de UMS, la activación del inflammasoma parece ser mediada por fagocitosis, en que la unión deficiente a lisosomas o la función deficiente de catepsina B resultaría en falla para desencadenar la actividad del inflammasoma NALP3. En este proceso se induce la formación de especies reactivas de oxígeno con la disociación del complejo estable TXNIP-TRX citoplásmico. La unión de TXNIP al NLRP3 tiene la posibilidad *in vitro* de activarlo¹⁷.

La exposición a urato monosódico o adenosintrifosfato en los modelos *in vitro* incrementan el flujo de potasio hacia el exterior de la célula, promoviendo los cambios conformacionales de la región C-terminal del NALP3. Estos cambios permiten el reclutamiento de las proteínas adaptadoras ASC y la procaspasa-1. Se ha observado también que en general debe existir un segundo estímulo inflamatorio o estimulación repetitiva para estimular la transcripción génica efectiva de los precursores de las citocinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18. Así, la activación del complejo formado por el inflammasoma NALP3 resulta en la ruptura proteolítica de la procaspasa-1 para producir caspasa-1 activa, la cual finalmente degrada a la proIL-1 β para producir IL-1 β y facilita la activación de IL-18¹⁸ (Figura 1).

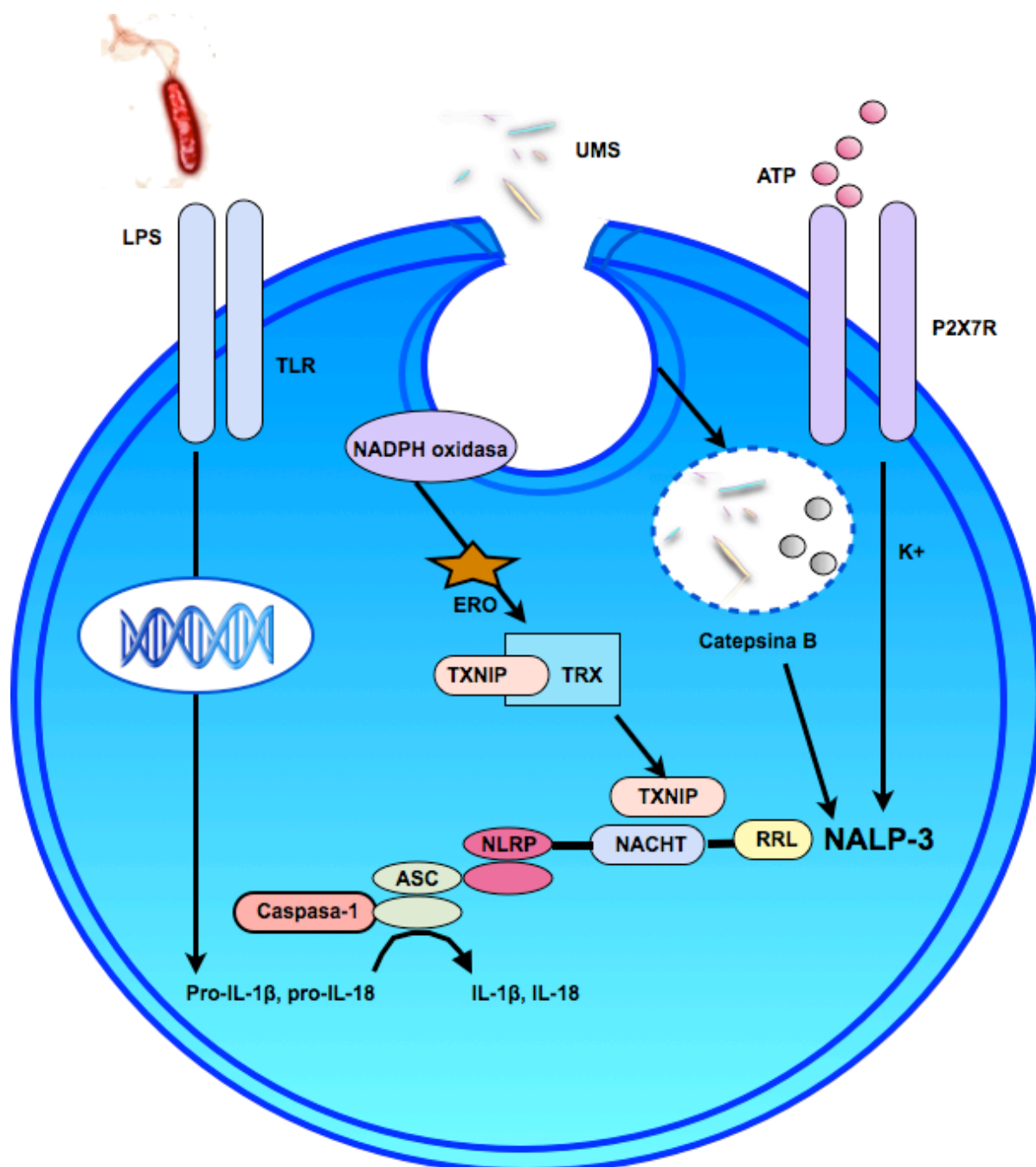


FIGURA 1. Mecanismos propuestos para la señalización intracelular a través de NLRP-3.

LPS: Lipopolisacárido, TLR: receptor tipo Toll, UMS: urato monosódico, ATP: adenosín trifosfato, P2X7R: receptor purinérgico P2X, canal iónico activado por ligando 7, ERO: especies reactivas de oxígeno, TXNIP: proteína de interacción con tioredoxina, TRX: tioredoxina, ASC: proteína adaptadora asociada a partículas apoptóticas, NACHT: dominio central de unión y oligomerización de nucleótidos, RRL: dominio rico en leucinas. Adaptado de la Referencia 16.

3. JUSTIFICACIÓN

El inflamasoma NALP3 constituye una parte del vínculo fundamental entre el estímulo causal de la gota (presencia de UMS cristalizado) y las manifestaciones histopatológicas de un ataque articular agudo (influjo de cantidades masivas de neutrófilos), con las células del linaje monocítico/macrofágico como el posible modulador de este vínculo. Varios estudios independientes han puesto de manifiesto el involucro del inflamasoma NALP3 y el papel de diversas citocinas resultantes de este inflamasoma, en particular IL-1 β , en promover el daño cartilaginoso y óseo en la gota aguda.¹⁹ A pesar de la presencia del estímulo, la mayor parte de los pacientes con hiperuricemia asintomática no desarrollan inflamación articular aguda. Dicha diferencia puede deberse a la expresión diferencial de uno o más componentes del inflamasoma NALP3 en comparación con los pacientes que presentan ataque agudo de gota o que tienen gota tofácea crónica en periodo intercrítico. Dicha información podría ser relevante para identificar si hay un subgrupo de pacientes que puede beneficiarse del tratamiento con agentes hipouricemiantes como profilaxis de episodios articulares agudos y si hay relación con características clínicas o ultrasonográficas encontradas.

4. OBJETIVOS

El objetivo primario del estudio fue describir los niveles de expresión de dos de los componentes del inflamasoma NALP3 (caspasa 1 y NLRP-3) en monocitos de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de gota aguda, fase intercrítica de gota tofácea crónica e hiperuricemia asintomática. El objetivo secundario fue comparar los promedios de las mediciones descritas en los diferentes grupos para conocer si había un grupo en que dichos niveles fueran significativamente mayores.

5. HIPÓTESIS

Establecemos como hipótesis de estudio, que los individuos asintomáticos con hiperuricemia crónica no tienen activado el inflammasoma NALP3, aún cuando presenten depósitos intracartilaginosos de UMS, a diferencia de los pacientes con gota aguda en que con alta probabilidad se encontrarán mayores niveles de expresión del mecanismo mencionado. En caso de ser correcta la hipótesis, sugeriría que la falta de activación del inflammasoma NALP3 limita el reconocimiento de los cristales de UMS por los sinoviocitos tipo A, evitando la activación de las células endoteliales y el posterior influjo de neutrófilos al interior de la articulación.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Se trata de un estudio descriptivo, abierto, exploratorio, observacional y analítico, de corte transversal.

Ubicación temporal y espacial

Se incluyeron pacientes ambulatorios y hospitalizados en el Hospital General Dr. Manuel Gea González y el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez de mayo de 2012 a junio de 2013. Los individuos asintomáticos con hiperuricemia crónica se obtuvieron de la Clínica de Diabetes del Hospital General Dr. Manuel Gea González, mientras que los pacientes con gota fueron reclutados en la consulta externa de reumatología, Unidad de Cuidados Coronarios y área de hospitalización de cardiología en el Instituto Nacional de Cardiología. El procesamiento y análisis de muestras biológicas fue realizado en el departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología.

Criterios de selección de la muestra

Se incluyeron en el estudio pacientes mayores de 18 años con hiperuricemia asintomática crónica, definida como elevación persistente de ácido úrico >6.8 mg/dL en suero en al menos dos determinaciones seriadas con ≥ 1 año de separación entre ellas, que no habían presentado síntomas musculoesqueléticos sugestivos de gota previamente y que aceptaron participar aportando una muestra de 10 ml de sangre periférica como lo expresaron firmando el formato de consentimiento informado (Anexo 1). Todos los individuos fueron sometidos a examen clínico por un reumatólogo para confirmar la

ausencia de involucro musculoesquelético. Se excluyó a aquellos individuos en tratamiento habitual con medicamentos hipouricemiantes, glucocorticoides, antiinflamatorios no esteroideos, o con comorbilidades reumatológicas inflamatorias concomitantes o insuficiencia renal crónica.

Como controles positivos se reclutaron pacientes con ataque agudo de gota de no más de 72 horas de evolución de acuerdo con los criterios de ataque agudo de gota ACR 1977²⁰ (Tabla 1). Como controles negativos se incluyeron pacientes con diagnóstico de gota (diagnóstico confirmado con análisis de líquido sinovial en cualquier momento) en periodo intercrítico, con al menos tres meses en remisión de cualquier síntoma o signo musculoesquelético. Es requisito para inclusión en ambos grupos control que los pacientes aceptaran aportar una muestra de 10 ml de sangre periférica como lo expresaron firmando el formato de consentimiento informado (Anexo 1). Para cada paciente se llenó un formato de recolección de datos demográficos y clínicos (Anexo 2). Se excluyó a aquellos pacientes con comorbilidades reumatológicas concomitantes o insuficiencia renal y tratamiento sustitutivo de la función renal por diálisis o hemodiálisis. Los casos fueron asignados de forma secuencial a uno de los tres grupos (hiperuricemia crónica asintomática, gota aguda, gota intercrítica) de acuerdo a los criterios de inclusión descritos.

TABLA 1. Criterios de clasificación para gota aguda, ACR 1977

Gota aguda
Más de un ataque de artritis aguda
Inflamación máxima desarrollada en las primeras 24 horas
Ataque monoarticular
Eritema en articulaciones
1a metatarsofalángica dolorosa o inflamada
Primer ataque en 1a metatarsofalángica, unilateral
Ataque unilateral a tarso
Tofo (sospechoso o comprobado)
Hiperuricemia
Aumento de volumen asimétrico por radiografía
Quistes subcorticales sin erosiones por radiografía
Microcristales de urato monosódico monohidratado obtenido por artrocentesis durante ataque
Cultivo de líquido sinovial negativo durante ataque agudo

Criterios de eliminación

Se eliminó del análisis a los pacientes cuya medición de caspasa 1 o NLRP fue reportada como defectuosa.

Definición de variables

Se incluyeron características demográficas (edad y sexo) como variables independientes. Las variables dependientes estudiadas fueron los niveles medidos de los transcritos de caspasa-1 y NLRP-3 mediante PCR tiempo real semicuantitativo (Tabla 2).

TABLA 2. Variables estudiadas

Variable	Escala
Edad	Cuantitativa continua de 19 a 83 años
Sexo	Nominal: femenino / masculino
CASP-1	Cuantitativa continua de 0.00216 a 0.0302
NLRP-3	Cuantitativa continua de 0.00151 a 0.0157

Consideraciones éticas

Este trabajo se realizó de acuerdo con los principios establecidos en la Declaración de Helsinki y en el Reglamento en Materia de Investigación para la Salud contemplada en la Ley General de Salud, en su título segundo, capítulo I, artículo 17, sección II. Se consideró como de mínimo riesgo de acuerdo al Comité de Ética en investigación del Hospital General Dr. Manuel Gea González. Se anexa hoja de consentimiento informado (Anexo 1).

Procedimiento

Colección y procesamiento de muestras

Mediante punción antecubital con técnica aséptica se obtuvieron, por sistema de vacío, 3.5 mL en tubo con activador de coagulación aplicado por aspersion y gel de polímeros separador de suero y 5 mL de sangre venosa en tubo con EDTA K₂ aplicado por aspersion.

Determinación de citocinas en suero

El tubo con gel activador se colocó inmediatamente en frío para mantener las muestras a 4°C para su transporte desde el sitio en que se reclutó a los pacientes al laboratorio en que se analizaron las muestras. Las muestras fueron centrifugadas a 2500 rpm, durante 15 minutos. El suero extraído fue almacenado en alícuotas de 500 µL en tubos Eppendorf nuevos a -75°C para su análisis posterior (medición de IL-18 e IL-1β por ELISA).

A partir del tubo con EDTA K₂ se realizó la separación de poblaciones celulares empleando el reactivo para separación por gradiente HISTOPAQUE-1077. Las poblaciones celulares obtenidas se evaluaron mediante análisis de morfología y granularidad con el equipo Beckman Coulter LH 750 y por tinciones con azul tripano. El aislamiento del RNA se realizó a partir de las células resultantes de la separación, empleando el método de fenol:cloroformo isotiocianato de guanidina con el reactivo Tripure (Roche). Se visualizó la integridad del RNA ribosomal 18S y 28S en gel de agarosa al 1.5%, se indujo la separación mediante electroforesis con 70 volts durante 40 minutos y se tiñó con bromuro de etidio para su posterior observación con luz UV. La concentración y pureza del RNA se realizó por espectrofotometría de NanoDrop 1000 a una longitud de onda de 260 y 280 nm, con una relación observada mayor a 1.6. De 1000 ng de este RNA se sintetizó cDNA.

Se realizó reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real utilizando un Termociclador LightCycler 2.0 para la medición de NALP3, CASP-1 y GAPDH (éste último como gen de referencia). Se utilizaron sondas de hidrólisis de la Biblioteca de Sondas Universales de Roche y diseños de primer que abarcaron un intrón con los iniciadores para NLRP3 (NM_001127461.2, NM_001079821.2, NM_004895.4, NM_001127462.2, NM_183395.2) 5'-tgtcctccaagctcctct-3', 5'-aagcagcactcatgcgaga-3'; CASP-1 (NM_033295.2, NM_033294.2, NM_033293.2, NM_001223.3, NM_033292.2) 5'-ccaggacattaaaataaggaaactgt-3', 5'-ccaaaaacctttacagaaggatctc-3' y el gen de referencia GAPDH (NM_002046.3) 5'-agccacatcgctcagacac-3', 5'-gcccaatcgcaccaaactcc-3'. Para el control de calidad de los ensayos de PCR cuantitativa se realizó la determinación de la linealidad y reproducibilidad (CV <10%).

Análisis estadístico

Se utilizaron proporciones para variables dicotómicas y nominales, mientras que para variables dimensionales se utilizaron promedios con desviación estándar o medianas con intervalos intercuantiles, según el tipo de distribución observada.

Las proporciones se compararon con la prueba exacta de Fisher o con chi cuadrada, según correspondía. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar muestras independientes, y ya que la comparación se realizó entre más de dos grupos, se usó análisis de varianza de Kruskal-Wallis (con post test de Dunn).

Para la prueba de hipótesis, se fijó como valor arbitrario de significancia <0.05 y todos los análisis se realizaron a dos colas. La base de datos se creó en el programa Excel y el análisis con el paquete estadístico GraphPad Prism versión 4.02.

7. RESULTADOS

En el presente estudio se incluyó a 74 pacientes captados entre mayo de 2012 y junio de 2013, 44 del Hospital General Dr. Manuel Gea González con hiperuricemia crónica y 26 en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, de los cuales 15 se encontraban en ataque agudo de gota y 11 en periodo intercrítico. El porcentaje de mujeres con hiperuricemia crónica fue diferente de la proporción descrita en los otros dos grupos de estudio (56.8% en el grupo de hiperuricemia crónica, en comparación con 20% en el grupo de gota aguda y 9% en el grupo de gota intercrítica, $p < 0.013$). La edad promedio de los pacientes en los tres grupos fue similar (56 ± 13.86 , 61.6 ± 13.27 y 58.8 ± 13.54 , $p = 0.27$). Las características demográficas de los pacientes de los tres grupos se demuestran en la Tabla 3.

TABLA 3. Características demográficas de los pacientes con gota aguda, gota intercrítica e hiperuricemia crónica.

	Gota aguda (n=15)	Gota intercrítica (n=11)	Hiperuricemia crónica (n=44)	p
Sexo femenino	3 (20)	1 (9)	25 (56.8)	0.013
Edad	56 ± 13.86	61.6 ± 13.27	58.8 ± 13.54	NS

Los datos se expresan como frecuencias simples (porcentajes). Los datos con distribución normal se expresan como medias \pm DE. El valor de p se calculó utilizando la prueba de Kruskal-Wallis con post-prueba de Dunn.

Se realizaron las mediciones de los transcritos de RNA para caspasa-1 y NLRP-3 en los tres grupos. La distribución de las mediciones entre los grupos fue no gaussiana. No se encontraron diferencias en las medianas entre los tres grupos tanto en la medición de Caspasa-1 (0.00631 vs 0.00604 vs 0.00636, $p = 0.81$) ni en NLRP-3 (0.003635 vs 0.00373 vs 0.00395, $p = 0.55$). Los resultados del estudio se resumen en la Tabla 4 y la Figura 2.

TABLA 4. Niveles de Caspasa-1 y NLRP-3 en los pacientes con gota aguda, gota intercrítica e hiperuricemia crónica.

	Gota aguda (n=15)	Gota intercrítica (n=11)	Hiperuricemia crónica (n=44)	p
Caspasa-1	0.0063 (0.0035-0.009)	0.006 (0.0056-0.0068)	0.0064 (0.0048-0.0081)	NS
NLRP-3	0.0036 (0.0028-0.0044)	0.0037 (0.0032-0.0047)	0.0039 (0.0029-0.0053)	NS

Los datos no mostraron distribución normal, por lo que se expresan como mediana (percentil25--percentil75). Los valores de p fueron calculados con la prueba de Kruskal-Wallis con post-prueba de Dunn.

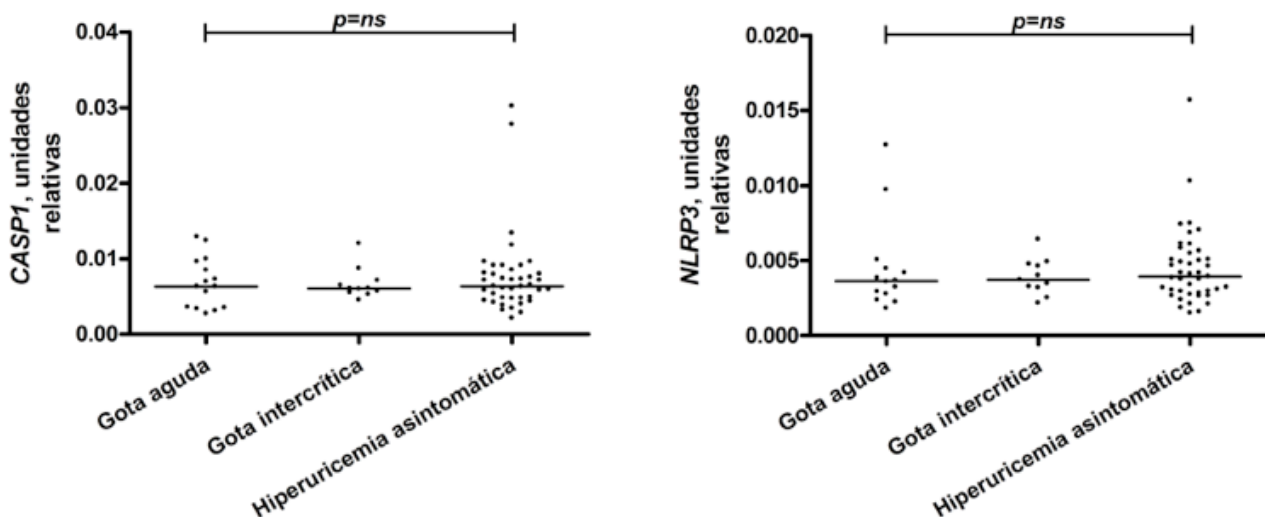


FIGURA 2. Niveles de CASP1 y NLRP3 en los grupos de pacientes con gota aguda, gota intercrítica e hiperuricemia asintomática. CASP1: caspasa-1, NLRP3: criopirina, ns: no significativo.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La inflamación mediada por el inflamasoma NALP-3 ha sido bien descrita para la gota aguda, sin embargo en el presente estudio no fue posible demostrar diferencias significativas en los niveles de dos de sus componentes, caspasa 1 y NLRP-3, en los diferentes grupos de estudio. Hay múltiples factores que podrían contribuir a los resultados encontrados. Por principio, el diseño del estudio dificulta la atribución específica de los resultados únicamente a la entidad clínica tratada ya que no se pudo obtener suficiente muestra para comparar grupos pareados para edad y sexo. Por el momento no se cuenta con la información demográfica y clínica completa de los participantes del estudio por lo que no es posible asumir que los pacientes incluidos en los diferentes grupos son parecidos en comorbilidades o tratamiento médico habitual.

En los pacientes con hiperuricemia crónica, hay sólo una proporción entre ellos en los que se ha demostrado que hay depósito de cristales de UMS con cambios estructurales verificables por ultrasonografía. Será necesario determinar si estos pacientes tienen diferencias en la expresión del inflamasoma NALP3 en comparación con los que no tienen evidencia de depósito. Asimismo, debe verificarse si hay expresión semejante en interleucinas o componentes del inflamasoma con los pacientes con gota intercrítica al tener en ambos evidencia de depósito intraarticular. Es posible que en este segmento de pacientes con evidencia de daño estructural el inflamasoma efectivamente se encuentre

con menor activación que en los otros grupos estudiados, acorde con la hipótesis del presente estudio, pero que las diferencias en los grupos no puedan ser evidenciadas al no haber hecho esta distinción entre ambos subgrupos.

Otra razón probable para no encontrar diferencias entre los grupos es que sólo se realizó la medición de los transcritos de CASP1 y NLRP3. Un componente más a considerar es ASC (proteína adaptadora asociada a apoptosis con dominio CARD). Esta última es una proteína adaptadora que en la forma inactiva del inflammasoma está unida a CASP1 y NLRP3 y parece contribuir a evitar la activación del mecanismo con un probable papel regulador²¹. En los diferentes estudios *in vitro* se identifica que la inflamación inducida por NALP-3 en general requiere, además de un estímulo inicial como los cristales intrarticulares, la inducción de la actividad mediada por TLR4 como las cadenas de ácido graso libre o el lipopolisacárido²². La estimulación repetida por estímulos agudos previos apoyaría la posibilidad de encontrar niveles mayores de CASP-1 y otras citocinas²³ en comparación con los pacientes con hiperuricemia crónica como se predijo para los pacientes con gota intercrítica pero en el presente estudio tampoco se corroboró dicho cambio.

La correlación de la expresión de los transcritos mencionados con la expresión de las citocinas de la vía (IL-1 β , IL-18, TNF- α , IL-6) demostrará si en realidad los criterios de inclusión de los pacientes en gota aguda contemplan el tiempo adecuado para encontrar las diferencias en la expresión de CASP-1 y NLRP-3. En estudios realizados en modelos murinos se ha corroborado que al analizar monocitos de sangre periférica se espera incremento en la expresión de IL-1 β y TNF- α en los primeros 3 días desde la exposición a los cristales de UMS, y que previo a la disminución significativa en dichos niveles se espera un incremento importante en la producción de TGF- β , anunciando la resolución del ataque agudo²⁴. Así, es posible que si los pacientes fueron incluidos dentro de las primeras 72 horas desde el inicio del ataque y dicho tiempo no es apropiado para traducir modificaciones en la expresión génica por la vía del inflammasoma, tanto los niveles de las citocinas como de los transcritos de CASP-1 y NLRP-3 pueden no reflejar la inflamación vista en un episodio de gota aguda.

Por otra parte, los estudios previos realizados han demostrado que la modificación en la expresión de las citocinas proinflamatorias ocurren *in vivo* pero en monocitos encontrados en la articulación afectada.²⁵ Reproducir dichos hallazgos en pacientes puede suponer

limitaciones éticas si se considera el hecho que los pacientes con hiperuricemia crónica y gota intercrítica no cursan con indicación de artrocentesis. Así, el grupo de estudio del que podrían obtenerse monocitos en líquido sinovial sería, por ejemplo, pacientes que se someten a cirugía articular abierta o artroscópica eliminando aquellas situaciones en las que el inflammasoma podría estar modificado como en la artritis séptica^{26, 27}.

Finalmente, el grupo de pacientes con gota aguda fue captado en el Instituto Nacional de Cardiología y algunos de ellos también cursaban sus primeros días posteriores a un evento agudo de Infarto al miocardio. Aunque la hiperuricemia es reconocida como un factor de riesgo cardiovascular,^{28,29,30} hasta hace poco tiempo ha sido posible relacionarla con mayor frecuencia de eventos isquémicos agudos³¹. Hay algunos trabajos *in vitro* en que se reporta el daño por reperusión posterior a isquemia miocárdica inducido por los componentes del inflammasoma NALP3 en fibroblastos³² y miocardiocitos³³. La validez de las observaciones mencionadas y su papel real en las repercusiones funcionales y estructurales en el corazón o la posibilidad de influir en la expresión sistémica de las citocinas inducidas por el inflammasoma NALP3 aún están por determinarse³⁴.

9. CONCLUSIONES

No encontramos diferencias en los niveles de Caspasa-1 o NLRP-3 en los pacientes incluidos con hiperuricemia crónica, gota aguda y gota intercrítica, sin embargo es posible que esto se deba a diferentes factores metodológicos. Será necesario continuar la valoración de la expresión del inflammasoma contemplando a cada uno de sus componentes además de su traducción en niveles de las interleucinas involucradas en la vía. Este estudio propone la necesidad de incluir tanto información clínica como ultrasonográfica que permita comparar pacientes de características similares y evaluar de forma particular la influencia del depósito de cristales de urato monosódico intrarticular en los diferentes cuadros clínicos. La información generada sobre este tema posiblemente podrá ayudar a identificar a un segmento de pacientes que se beneficie en mayor medida de recibir tratamiento hipouricemiante desde etapas subclínicas de la enfermedad.

ANEXO 1. Formato de consentimiento informado

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE INFORMADO

Fecha: _____

Proyecto de investigación:

Perfil de expresión del inflammasoma NALP3 en individuos asintomáticos con hiperuricemia crónica y daño estructural articular asociado al depósito de urato monosódico.

En este momento de está llevando a cabo en nuestro Instituto un estudio de investigación que tiene como objetivo analizar y medir varias sustancias inflamatorias y la expresión de algunos genes en pacientes Mexicanos con elevación del ácido úrico en sangre. Este proyecto se encuentra aprobado y registrado ante el Comité de Investigación de este Instituto.

Si acepta, la participación de usted en este estudio consistirá en proporcionar 2 tubos de sangre venosa (de manera similar a cuando le toman sangre para estudios de laboratorio de rutina) y contestar algunas preguntas generales como edad y uso de medicamentos. Además, es probable que se le realice un estudio de ultrasonido en sus rodillas y pies; este estudio no usa radiaciones y no duele ni se siente nada. Estos procedimientos no conllevan ningún riesgo para usted o quienes lo rodean. Todos los estudios que se realicen dentro de este protocolo no conllevan ningún costo para usted.

La decisión de participar en este estudio es completamente voluntaria y anónima, y su decisión de ninguna forma influirá en la atención médica ni el tratamiento que usted recibe. Toda la información personal se manejará siempre de manera confidencial. Además, usted tiene toda la libertad de retirar su participación en cualquier momento del estudio.

Finalmente, le solicitamos su autorización para que los resultados de este estudio puedan ser presentados en reuniones científicas y, en su caso publicados en revistas médicas, previa condición de que los datos relacionados con su privacidad serán manejados con completa confidencialidad y ninguna presentación permitirá su identificación.

Si usted tiene cualquier duda sobre el estudio, puede dirigirse con los doctores Luis Humberto Silveira Torre en el departamento de Reumatología o Luis Manuel Amezcua Guerra en el departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología, o con el Dr. Pedro Rodríguez Henríquez en el departamento de Reumatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Nombre y firma del paciente:

Nombre y firma del testigo 1:

Nombre y firma del testigo 2:

ANEXO 2. Formato de recolección de datos

Perfil de expresión del inflammasoma NALP3 en individuos asintomáticos con hiperuricemia crónica y daño estructural articular asociado al depósito de urato monosódico

Fecha: ____/____/____

Nombre:

Registro:

Edad:

Género: (M) (F)

HAS (No) (Si) Años de diagnóstico _____
Tratamiento (fármacos) _____

DM (No) (Si) Años de diagnóstico _____
Tratamiento (fármacos) _____

Dislipidemia (No) (Si) Años de diagnóstico _____
Tratamiento (fármacos) _____

Otras enfermedades relevantes (con tratamiento):

Únicamente para pacientes con gota aguda

1- Años de diagnóstico de hiperuricemia _____ años

2- Años de diagnóstico de gota _____ años

3- Uso de alopurinol (No) (Sí) _____ años

4- Tiempo (en meses) de último periodo intercrítico _____ meses

Del ataque actual

¿Cuáles articulaciones inflamadas? _____

	¿Tofos?	(No)	(Sí)	
	¿Artrocentesis?	(No)	(Sí)	
Tratamiento	AINE	(No)	(Sí)	
	Esteroides sistémico	(No)	(Sí)	Dosis _____
	Esteroides intrarticular	(No)	(Sí)	
	Analgésico	(No)	(Sí)	

Una semana después

¿Remitió el ataque de gota? (No) (Sí)

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Edwards NL. Gout. En: Klippel JH, ed. *Primer on the rheumatic diseases*. New York: Springer Science, 2008: 241-9.
- ² Pillinger MH, Rosenthal P, Abeles AM. Hyperuricemia and gout. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2007; 65:215-21.
- ³ Burt HM, Dutt YC. Growth of monosodium urate monohydrate crystals: effect of cartilage and sinovial fluid components on in vitro growth rates. *Ann Rheum Dis* 1986; 45:858-64.
- ⁴ McQueen FM, Chhana A, Dalbeth N. Mechanisms of joint damage in gout: evidence from cellular and imaging studies. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8:173-81.
- ⁵ Grassi W, Meenagh G, Pascual E, Filippucci E. "Crystal Clear" – Sonographic assessment of gout and calcium pyrophosphate deposition disease. *Semin Arthritis Rheum* 2006; 36:197-202.
- ⁶ Thiele RG, Schlesinger N. Diagnosis of gout by ultrasound. *Rheumatology (Oxford)* 2007; 46:1116-21.
- ⁷ Pineda C, Amezcua-Guerra LM, Solano C, Rodriguez-Henríquez P, Hernández-Díaz C, Vargas A, Hofmann F, Gutiérrez M. Joint and tendon subclinical involvement suggestive of gouty arthritis in asymptomatic hyperuricemia: an ultrasound controlled study. *Arthritis Res Ther* 2011; 13:R4.
- ⁸ De Miguel E, Puig JG, Castillo C, Peiteado D, Torres RJ, Martín-Mola E. Diagnosis of gout in patients with asymptomatic hyperuricaemia: a pilot ultrasound study. *Ann Rheum Dis* 2012; 71:157-8.
- ⁹ Champion EW, Glynn RJ, DeLabry LO. Asymptomatic hyperuricemia. Risks and consequences in the Normative Aging Study. *Am J Med* 1987; 82:421-6.
- ¹⁰ Zhu Y, Pandya B, Choi H. Prevalence of hiperuricemia in the US general population: the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2008. *Arthritis Rheum* 2010; 62(10 Suppl):S1363.
- ¹¹ Zhu Y, Pandya B, Choi H. Increasing gout prevalence in the US over the last two decades: the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Arthritis Rheum* 2010; 62(10 Suppl):S2154.
- ¹² Schlesinger N. Can ultrasonography make identification of asymptomatic hyperuricemic individuals at risk for developing gouty arthritis more cristal clear?. *Arthritis Res Ther* 2011; 13:107.
- ¹³ Boskey AL. Pathogenesis of cartilage calcification: Mechanisms of crystal deposition in cartilage. *Curr Rheumatol Rep* 2002; 4:245-51.
- ¹⁴ Laurent TC. Solubility of sodium urate in the presence of chondroitin-4-sulphate. *Nature* 1964; 202:1334.
- ¹⁵ Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010; 140:821-32.

- ¹⁶ Jin C, Flavell RA. The missing link: how the inflammasome senses oxidative stress. *Immunology and Cell Biology*. 2010;88:510–2.
- ¹⁷ Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 2010; 11:136–40.
- ¹⁸ Kingsbury SR, Conaghan PG, McDermott MF. The role of the NLRP3 inflammasome in gout. *J Inflamm Res* 2011; 4:39-49.
- ¹⁹ Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006; 440::237-41.
- ²⁰ Wallace SL, Robinson H, Masi AT, Decker JL, McCarty DJ, Yi TF. Preliminary criteria for the classification of the acute arthritis of primary gout. *Arthritis Rheum* 1977;20:895-900.
- ²¹ Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death and Differentiation* 2007;14:10–22.
- ²² Gong Y, Wang X, Wang J, Yang Z, Li S, Yang J, Liu L, Lei X, Shao F. Chemical probing reveals insights into the signaling mechanism of inflammasome activation. *Cell Research* 2010;20:1289-305.
- ²³ Martin WJ, Shaw O, Liu X, Steiger S, Harper JL. Monosodium Urate Monohydrate Crystal–Recruited Noninflammatory Monocytes Differentiate Into M1-like Proinflammatory Macrophages in a Peritoneal Murine Model of Gout. *Arthr Rheum* 2011;63:1322-32.
- ²⁴ Yagnik DR, Evans BJ, Florey O, Mason JC, Landis RC, Haskard DO. Macrophage Release of Transforming Growth Factor β 1 During Resolution of Monosodium Urate Monohydrate Crystal–Induced Inflammation. *Arthr Rheum*. 2004;50:2273–80.
- ²⁵ Joosten LAB, Netea MG, Mylona E, Koenders MI, Subbarao-Malireddi RK, Oosting M, Stienstra R, van de Veerdonk FL, Stalenhoef AF, Giamarellos-Bourboulis EJ, Kanneganti T, van der Meer JDW. Engagement of Fatty Acids With Toll-like Receptor 2 Drives Interleukin-1 β Production via the ASC/Caspase 1 Pathway in Monosodium Urate Monohydrate Crystal–Induced Gouty Arthritis. *Arthr Rheum*. 2010;62:3237-48.
- ²⁶ Bryant C, Fitzgerald KA. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends Cell Biol* 2009; 19: 455–64.
- ²⁷ Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 229–65.
- ²⁸ Vandanmagsar B, Youm Y, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin RE, Stephens JM, Dixit VD. The NALP3/NLRP3 Inflammasome Instigates Obesity-Induced Autoinflammation and Insulin Resistance. *Nat Med*. 2011;17:179–88.
- ²⁹ Lottmann K, Chen X, Schädlich PK. Association Between Gout and All-Cause as well as Cardiovascular Mortality: A Systematic Review. *Curr Rheumatol Rep*. 2012;14:195–203.
- ³⁰ Shah A, Keenan RT. Gout, Hyperuricemia, and the Risk of Cardiovascular Disease: Cause and Effect? *Curr Rheumatol Rep*. 2010;12:118–24.

- ³¹ Crittenden DB, Lehmann RA, Schneck L. Colchicine Use Is Associated with Decreased Prevalence of Myocardial Infarction in Patients with Gout. *J Rheumatol* 2012;39:1458-64.
- ³² Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, Izawa A, Takahashi Y, Masumoto J, Koyama J, Hongo M, Noda T, Nakayama J, Sagara J, Taniguchi S, Ikeda U. Inflammasome Activation of Cardiac Fibroblasts Is Essential for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation*. 2011;123:594-604.
- ³³ Mezzaroma E, Toldo S, Abbate A. Role of NLRP3 (cryopyrin) in acute myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2013; 99:225-6.
- ³⁴ Grundmann S, Bode C, Moser M. Inflammasome Activation in Reperfusion Injury: Friendly Fire on Myocardial Infarction? *Circulation*. 2011;123:574-6.