



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

**POLIMORFISMO EXTRAPITUITARIO -1149 DE *PRL* EN PACIENTES CON ARTRITIS
REUMATOIDE DEL SUR DE MÉXICO: ASOCIACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE SU
mRNA Y VARIABLES CLÍNICAS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**

PRESENTA:

M. EN C. JOSÉ EDUARDO NAVARRO ZARZA

TUTOR:

DR. JOSÉ FRANCISCO MUÑOZ VALLE

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias de la Salud

Ciudad de México, Julio 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	7
SUMMARY.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. ANTECEDENTES.....	12
2.1 Artritis reumatoide (AR)	12
2.1.1 Etiología.....	13
2.1.1.1 Factores genéticos.....	14
2.1.1.2 Factores ambientales.....	15
2.1.1.3 Factores hormonales.....	16
2.1.2 Epidemiología.....	17
2.1.3 Patología.....	18
2.1.3.1 Patogénesis.....	19
2.1.3.2 Respuesta inmune.....	20
2.1.3.3 Autoanticuerpos.....	23
2.2 Prolactina (PRL).....	24
2.2.1 Generalidades y funciones biológicas de la PRL.....	24
2.2.2 Estructura de la PRL.....	25
2.2.2.1 Variantes estructurales de la PRL.....	25
2.2.3 Localización y regulación de la expresión del gen PRL.....	26
2.2.4 La PRL como inmunoregulador.....	28
2.2.5 Papel de PRL en AR.....	29
2.2.6 Polimorfismo -1149 de PRL.....	31
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33
4. HIPÓTESIS.....	34
5. OBJETIVOS.....	35

5.1 Objetivo general.....	35
5.2 Objetivos específicos.....	35
6. DISEÑO METODOLÓGICO.....	36
6.1 Tipo de estudio.....	36
6.2 Sede del estudio.....	36
6.3 Consideraciones éticas.....	36
6.4 Universo de estudio.....	36
6.5 Periodo de estudio.....	36
6.6 Tamaño de la muestra.....	37
6.7 Selección de muestras.....	37
6.7.1 Criterios de inclusión.....	37
6.7.2 Criterios de no inclusión.....	38
6.7.3 Criterios de exclusión.....	38
6.8 Unidades de observación.....	38
6.9 Variables.....	38
6.10 Criterios de interpretación.....	38
6.11 Definición y operacionalización de las variables.....	39
6.12 Diagrama general de la metodología.....	42
6.13 Evaluación clínica.....	43
6.14 Análisis inmunológico.....	44
6.14.1 Cuantificación de PRL.....	44
6.14.2 Cuantificación de anticuerpos anti-CCP.....	46
6.15 Análisis molecular.....	47
6.15.1 Extracción de DNA genómico.....	47
6.15.2 PCR-RFLP para la identificación del polimorfismo -1149 de <i>PRL</i>	48
6.15.3 Secuenciación del fragmento polimórfico de <i>PRL</i>	50
6.15.4 Extracción de RNA total.....	51
6.15.5 Transcripción reversa (RT)	52
6.15.6 PCR cuantitativa en tiempo real.....	53
6.16 Análisis Estadístico.....	54

7. RESULTADOS	56
7.1 Características demográficas de los pacientes y controles	56
7.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo -1149 G>T en el gen <i>PRL</i>	58
7.3 Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -1149 G>T en el gen <i>PRL</i> en pacientes con AR y SC	59
7.4 Asociación del SNP -1149 G>T en el gen <i>PRL</i> con características clínicas en AR	60
7.5 Niveles séricos de PRL en pacientes con AR y SC	61
7.6 Asociación del SNP -1149 G>T del gen <i>PRL</i> con niveles séricos de PRL, parámetros clínicos y actividad clínica en AR y SC	63
7.7 Asociación de los niveles séricos de PRL con actividad clínica y parámetros clínicos en AR	65
7.8 Expresión del mRNA del gen de <i>PRL</i> en AR y SC	68
8. DISCUSIÓN	70
9. CONCLUSIONES	79
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
11. ANEXOS	88
11.1 Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial	88
11.2 Carta de consentimiento informado	93
11.3 Datos demográficos	94
11.4 Índice DAS-28	96
11.5 Índice Spanish HAQ-DI	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Etiología de la AR.....	14
2. Desarrollo y progresión de la AR.....	19
3. Respuesta inmune de la AR.....	22
4. Vías de señalización PI3K, JAK/STAT y MAPK	24
5. Estructura de la PRL humana.....	25
6. Diagrama esquemático del gen <i>PRL</i> humano.....	27
7. Diagrama de relación de variables del estudio.....	39
8. Diagrama general de la metodología.....	42
9. Ensayo para la cuantificación de PRL.....	45
10. Esquema general de la técnica PCR-RFLP.....	50
11. Niveles séricos de PRL en pacientes con AR Y SC.....	62
12. Niveles séricos de PRL en pacientes con AR temprana y establecida.....	62
13. Figura 13 Correlación de los niveles séricos de PRL con la edad.....	63
14. Comparación de los niveles de PRL por genotipo en AR Y SC.....	63
15. Comparación de los niveles de FR por genotipo en AR y SC.....	64
16. Comparación de los niveles de pCr por genotipo en AR Y SC.....	64
17. Comparación de los niveles de PRL por DAS28 en AR.....	65
18. Correlación de los niveles de PRL con el HAQ en AR.....	66
19. Relación y comparación de los niveles de PRL con anti-CCP en AR.....	66
20. Niveles de PRL y su asociación con anti-MCV en AR.....	67
21. Niveles séricos de PRL y su relación con FR en AR.....	68
22. Expresión relativa de <i>PRL</i> en ambos grupos de estudio.....	68
23. Expresión relativa de <i>PRL</i> en pacientes con AR de acuerdo al genotipo....	69
24. Expresión relativa de <i>PRL</i> en pacientes con SC de acuerdo al genotipo....	69

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Criterios para el diagnóstico y la clasificación de AR (ACR/EULAR 2010).....	13
2. Definición y operacionalización de las variables del estudio.....	40
3. Características demográficas y clínicas de los pacientes con AR y SC.....	57
4. Parámetros de laboratorio y tratamiento de los pacientes con AR y SC.....	58
5. Determinación del Equilibrio de Hardy-Weinberg para el SNP -1149 G>T en el gen PRL.....	59
6. Análisis de divergencia genética y endogamia en regiones de México.....	59
7. Distribución del SNP -1149 en el gen PRL entre pacientes con AR y SC.....	60
8. Parámetros clínicos, índices de actividad y discapacidad en pacientes con AR de acuerdo al modelo genético dominante del SNP -1149 G>T en el gen PRL.....	61

RESUMEN

Antecedentes: La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica que se caracteriza por la inflamación crónica y destrucción progresiva de las articulaciones. Su etiología es compleja e involucra interacciones entre factores genéticos, ambientales y hormonales que promueven la pérdida de la tolerancia hacia antígenos propios favoreciendo la producción de autoanticuerpos incluso en etapas subclínicas de la enfermedad.

La prolactina (PRL) es considerada una hormona con propiedades inmunomoduladoras, ya que tiene la capacidad de activar a linfocitos T y B, los cuales son células clave en la fisiopatología de la AR. En el promotor extrapituitario del gen que codifica para la prolactina (*PRL*) se ubica el polimorfismo -1149 G>T, el cual se ha asociado con enfermedades autoinmunes, con lupus eritematoso generalizado (LEG) y AR.

El objetivo principal de esta tesis de doctorado fue analizar la asociación del polimorfismo *PRL* -1149G> T con la susceptibilidad a la enfermedad, la expresión del mRNA y la proteína PRL en pacientes con AR del sur de México.

Metodología: En el estudio se incluyeron 300 pacientes con AR y 300 sujetos control (CS). A los pacientes con AR se les determinaron los índices de actividad clínica (DAS-28) y de discapacidad funcional (HAQ-DI). A ambos grupos se les determinaron parámetros de laboratorio como: pCr y FR, por nefelometría; VSG, por el método Wintrobe, y se midieron los niveles séricos de los anticuerpos anti-CCP y de PRL mediante la técnica de ELISA. Los genotipos se identificaron mediante el método de PCR-RFLP, y la expresión de mRNA de PRL se determinó mediante PCR en tiempo real.

Resultados: La población del Sur de México se encontró en desequilibrio génico para el polimorfismo -1149 G>T del gen *PRL*, según el modelo de Hardy-Weinberg ($p \leq 0.05$). No obstante, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las frecuencias genotípicas ($p=0.01$) y alélicas ($p=0.004$) del polimorfismo entre pacientes con AR y sujetos control (SC). Así mismo, se aplicaron modelos genéticos de herencia (dominante, recesivo y aditivo), donde se observó una asociación significativa entre el

alelo T y la disminución de la susceptibilidad para la AR (OR=0.55, IC 95% 0.35-0.87, $p=0.009$; OR=0.09, IC 95% 0.012-0.76, $p=0.011$; OR=0.49, IC 95% 0.32-0.76, $p=0.001$, respectivamente). Por otro lado, se encontró que los pacientes con AR tenían mayor expresión de mRNA y niveles solubles de PRL que los SC ($p<0.05$). Cuando se compararon los niveles solubles de PRL por el tiempo de la evolución de la enfermedad, se observó que los pacientes con <2 años de evolución tenían niveles séricos más elevados que los pacientes con ≤ 2 años de evolución ($p=0.013$). Sin embargo, no hubo diferencias en los niveles séricos de PRL cuando se hizo la comparación por los diferentes genotipos del polimorfismo -1149 G>T del gen de *PRL*. Finalmente, los SC portadores de genotipos GT y TT mostraron una menor expresión de mRNA de *PRL* que los portadores de genotipo GG (7.1 veces y 20 veces respectivamente, $p=0.006$).

Conclusiones: El desequilibrio génico para el polimorfismo -1149 G>T de *PRL* en la población del Sur de México puede deberse a procesos de endogamia en la población. No obstante, se demostró que el alelo -1149T de *PRL* es un marcador genético de disminución del riesgo para desarrollar AR en la población del sur de México, y está asociado con la baja expresión de mRNA de *PRL* en sujetos sanos. Los niveles séricos de PRL disminuyen conforme al tiempo de evolución de la AR en los pacientes de la población del Sur de México.

SUMMARY

Background: Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease characterized by chronic inflammation and the progressive destruction of the joints. The etiology of RA is complex, it involves interactions between genetic, environmental and hormonal factors that promote the loss of tolerance to own antigens and initiate the production of autoantibodies even in subclinical stages of the disease.

Prolactin (PRL) is considered a hormone with immunomodulatory properties, as it has the ability to activate T and B lymphocytes, which are key cells in the pathophysiology of RA. The polymorphism -1149 G> T is located in the extrapituitary promoter of the gene coding for prolactin (PRL), which has been associated with autoimmune diseases, with generalized lupus erythematosus (LEG) and AR.

The principal objective of this project was to analyze the association of *PRL* -1149G> T polymorphism with disease susceptibility, mRNA expression and PRL protein in patients with RA in southern Mexico.

Methodology: The study included 300 RA patients and 300 control subjects (CS). Patients with RA have determined the rates of clinical activity (DAS-28) and functional disability (HAQ-DI). Both groups were determined laboratory parameters such as CRP and FR, by nephelometry; VSG, by the Wintrobe method, and serum levels of anti-CCP and PRL antibodies were measured by the ELISA technique. Genotypes were identified by the PCR-RFLP method, and *PRL* mRNA expression was determined by real-time PCR.

Results: The population of Southern Mexico was in a genetic imbalance for the polymorphism -1149 G> T of the *PRL* gene, according to the Hardy-Weinberg model ($p \leq 0.05$). However, statistically significant differences were observed in the distribution of genotypic ($p = 0.01$) and allelic ($p = 0.004$) frequencies of polymorphism between patients with RA and control subjects (CS). Likewise, genetic inheritance models (dominant, recessive and additive) were applied, where a significant association was observed between the T allele and the decrease in susceptibility for RA (OR = 0.55, 95% CI 0.35-0.87, $p = 0.009$; OR = 0.09, 95% CI 0.012-0.76, $p = 0.011$; OR = 0.49, 95% CI 0.32-0.76,

$p = 0.001$, respectively). On the other hand, it was found that patients with RA had higher mRNA expression and soluble levels of PRL than SC ($p < 0.05$). When soluble levels of PRL were compared by the time of disease evolution, it was observed that patients with < 2 years of evolution had higher serum levels than patients with ≤ 2 years of evolution ($p = 0.013$). However, there were no differences in serum PRL levels when the comparison was made by the different genotypes of the -1149 G > T polymorphism of the *PRL* gene. Finally, the SC carriers of GT and TT genotypes showed a lower expression of *PRL* mRNA than the GG genotype carriers (7.1 times and 20 times respectively, $p = 0.006$).

Conclusions: The gene imbalance for the polymorphism -1149 G > T of *PRL* in the population of Southern Mexico may be due to inbreeding processes in the population. However, it was shown that the -1149T *PRL* allele is a genetic marker of decreased risk for developing RA in the population of southern Mexico, and is associated with the low expression of *PRL* mRNA in healthy subjects. Serum levels of PRL decrease according to the time of evolution of RA in patients in the population of Southern Mexico.

1. INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es la enfermedad autoinmune más común, caracterizada por inflamación crónica de las articulaciones que conduce a la destrucción articular (cartílago y hueso), así como también a discapacidad. La etiología de la AR sigue siendo desconocida, pero se considera que es el resultado de la interacción entre factores genéticos, ambientales y hormonales.

La prolactina (PRL) es una hormona-citocina que se ha involucrado en enfermedades reumáticas autoinmunes como la AR debido a sus efectos inmunorreguladores y linfoproliferativos. La PRL es producida principalmente por células de la glándula pituitaria anterior, pero en humanos se ha descrito un promotor alternativo (también conocido como promotor superdistal o extrapituitario) que dirige la expresión de la PRL en varios tejidos extrapituitarios, como inmunitario, decidual, mamario, epitelial y células grasas. El promotor superdistal se encuentra río arriba del promotor pituitario y genera una transcripción alternativa, 150 pb más larga que el mRNA pituitario clásico. Ambos productos de la transcripción de *PRL* codifican para una proteína madura idéntica de 199 aminoácidos (23 kDa).

En el promotor extrapituitario de PRL se ha descrito un polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) en la posición -1149 G>T del gen *PRL* que afecta la actividad transcripcional. Los alelos G y T dan como resultado una expresión aumentada o disminuida de mRNA, respectivamente, esto de acuerdo a un estudio realizado en pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG). En pacientes con AR de población europea y del Occidente de México, el alelo T de *PRL* se ha asociado con la producción disminuida de PRL en leucocitos. Estos resultados respaldan la idea de que la PRL podría funcionar como un marcador genético para la disminución de la susceptibilidad de la AR.

Con base en lo anterior, es de nuestro interés analizar la asociación del polimorfismo extrapituitario -1149 G>T de *PRL* con la expresión del mRNA y la actividad clínica en AR, con el objetivo de evaluar si este polimorfismo es un marcador genético de susceptibilidad para AR en población del Sur de México.

2. ANTECEDENTES

2.1 ARTRITIS REUMATOIDE (AR)

La artritis reumatoide (AR) es una de las enfermedades autoinmunes más prevalentes, que se caracteriza por la inflamación crónica de la sinovia, principalmente de las articulaciones pequeñas de la mano, muñecas y pies [Aletaha, 2018]. La inflamación crónica puede conducir a la destrucción del cartílago y el hueso articular, ocasionando deformidad articular, incapacidad funcional, depresión e importantes costos económicos del individuo afectado [Smolen, 2018]. Por lo general, se presenta como una poliartritis simétrica, pero puede ser asimétrica en alrededor del 20% de los pacientes [Smolen, 2016; Angelotti, 2017].

La AR no tratada puede causar manifestaciones extraarticulares severas en los ojos, pulmones, corazón y otros órganos. Los nódulos reumatoides y la vasculitis se pueden observar en la AR grave, aunque actualmente son menos comunes debido al tratamiento en etapas tempranas de la enfermedad. Sin embargo, la enfermedad cardiovascular sigue siendo la causa principal de muerte en pacientes con AR [Turesson, 2016; Aletaha, 2018; Smolen, 2018].

La AR se caracteriza por la producción de autoanticuerpos, como lo son los anticuerpos contra proteínas citrulinadas (ACPA) y el factor reumatoide (FR). La presencia de estos autoanticuerpos se puede detectar en el 50-70% de los pacientes con AR antes del inicio de la enfermedad y en la fase temprana de la misma; y en un 60 a 90% de los pacientes con AR establecida. Los ACPA son más específicos para la AR que el FR (95% para ACPA y 85% para FR), lo que los convierte en un biomarcador importante [Nguyen, 2016; Volkov, 2019].

Para la clasificación y diagnóstico de la AR actualmente existen dos criterios. Los primeros fueron emitidos en 1987 por el Colegio Americano de Reumatología (ACR, por sus siglas en inglés *American College of Rheumatology*) y se enfocan en la clasificación de AR establecida [Arnett, 1988]. Los criterios más recientes emitidos en 2010 por el ACR y la Liga Europea Contra el Reumatismo (EULAR, por sus siglas en inglés *European*

League Against Rheumatism), permiten un diagnóstico temprano de la enfermedad y conservan una buena especificidad y sensibilidad para la enfermedad. Estos criterios, además de considerar al FR y otros marcadores de inflamación como la pCr y la VSG; incluyen marcadores serológicos tempranos y específicos de la AR como los anticuerpos anti-CCP, los cuales pueden presentarse hasta 10 años antes del inicio de la enfermedad, por lo que permiten identificar a sujetos con AR en etapa temprana (Cuadro 1) [Aletaha, 2010].

CUADRO 1. CRITERIOS PARA EL DIAGNÓSTICO Y LA CLASIFICACIÓN DE AR (ACR/EULAR 2010)

CRITERIO	PUNTAJE
A. Articulaciones involucradas	
1 articulación grande	0
2-3 articulaciones grandes	1
1-3 articulaciones pequeñas (con o sin involucro de articulaciones grandes)	2
4-10 articulaciones pequeñas (con o sin involucro de articulaciones grandes)	3
> 10 articulaciones (por lo menos una articulación pequeña)	5
B. Serología	
FR negativo y ACPA negativo	0
FR bajo positivo o ACPA bajo positivo	2
FR alto positivo o ACPA alto positivo	3
C. Reactantes de fase aguda	
pCr y VSG normales	0
pCr o VSG anormales	1
D. Duración de los síntomas	
< 6 semanas	0
≥ 6 semanas	1

FR, factor reumatoide; ACPA, anticuerpos contra proteína citrulinada; pCr, proteína C reactiva; VSG, velocidad de sedimentación globular.

(Modificado de Aletaha, 2010)

2.1.1 Etiología

La etiología de la AR hasta la actualidad es desconocida, pero se reconoce que varios factores están involucrados con el desarrollo de la AR, incluidos los factores genéticos, ambientales y hormonales (Figura 1). La interacción de estos factores promueve el desarrollo de la autoinmunidad y el inicio de proceso inflamatorio articular [McInnes, 2011].

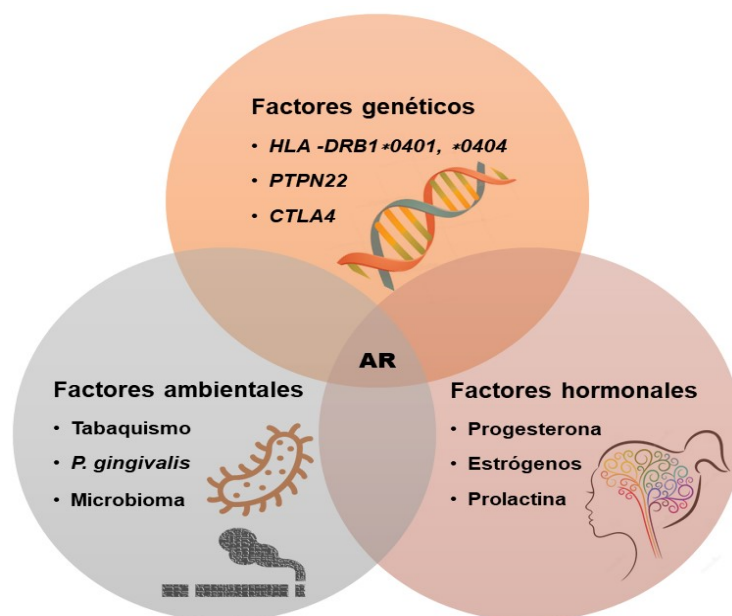


Figura 1 | Etiología de la AR. La AR se considera una enfermedad multifactorial, resultado de la interacción de factores genéticos, ambientales y hormonales.

2.1.1.1 Factores genéticos

El riesgo de desarrollar AR tiene un importante componente genético (60%) que aún no se comprende completamente [Amariuta, 2019]. Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han identificado diversos *loci* de riesgo asociados con la etiología de la AR. Actualmente, en AR, se han descrito más 100 genes asociados con susceptibilidad, protección, gravedad, actividad y respuesta a tratamiento [Okada, 2014; Viatte & Barton, 2017]. Sin embargo, uno de los descritos con anterioridad y que continúa siendo uno de los más importantes es el antígeno leucocitario humano II (HLA II, por sus siglas en inglés *Human Leucocyte Antigen*) ya que contribuye hasta en una tercera parte de componente genético asociado con la susceptibilidad a AR [Deighton, 1991], pero

estudios recientes indican que este porcentaje está sobreestimado. Los datos indican que el HLA-II contribuye sólo un 11% de la susceptibilidad [Kúrko, 2013].

Los alelos *HLA-DRB1*01:01*, **04:01*, **04:04* y **04:05* están asociados con AR, estos expresan una secuencia común de aminoácidos en la posición 67 a 74 de la cadena β 1, QKRAA, QQRAA y KKRAA que constituyen el llamado epítoto compartido (SE), se encuentran dentro del surco de unión a péptidos de la proteína HLA-DR β 1 [Choi, 2006; Silman, 2002]. Se han identificado otros genes de riesgo para AR como *PTPN22*, *PADI4*, *TNFR2*, *CTLA4*, *MIF*, *CD28* y de otras moléculas implicadas en la respuesta inmune cuyo grado de asociación con AR es variable entre poblaciones [Goronzy & Weyand, 2009; Kochi, 2010; Gregersen, 2010].

2.1.1.2 Factores ambientales

Los factores de riesgo ambientales reportados consistentemente incluyen el tabaquismo, infecciones y el bajo nivel socioeconómico o educativo. El tabaquismo se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar AR en pacientes positivos para ACPA y FR [Baka, 2009; Lundsöm, 2009]. También se ha sugerido que esta asociación es dependiente de los alelos SE, aunque los hallazgos no son consistentes [Costenbader, 2006; Svärd, 2015]. Se considera que fumar puede desencadenar una reacción inmune contra las proteínas citrulinadas, posiblemente induciendo la citrulinación de las células dañadas en el tracto broncoalveolar [Lee, 2014, Malmström, 2016].

Algunos agentes infecciosos como el virus del Epstein-Barr, parvovirus, lentivirus, y bacterias como *Mycoplasma*, *Mycobacteria* y *Proteus* podrían contribuir con el desarrollo de AR, sin embargo, ningún patógeno ha mostrado de manera concluyente ser un agente causal [Buch, 2002; Rashid, 2007; Toussiro, 2007]. Un factor importante entre los agentes infecciosos, es la bacteria *Porphyromonas gingivalis* que causa la periodontitis, enfermedad que es más frecuente en sujetos con AR que en la población sana [Koziel, et al., 2014]. *Porphyromonas gingivalis* es la única bacteria conocida que expresa la enzima peptidilarginina-desaminasa (pPAD análogo de la PADI4 humana), responsable del proceso de citrulinación de proteínas humanas, como: fibrinógeno y α -enolasa, y

produce una inflamación crónica y erosiva, con destrucción del hueso periodontal [Dietrich T, 2008; Lundberg K, 2010; Wegner, 2010]. La periodontitis tiene mecanismos fisiopatológicos similares a la AR, caracterizados por la reabsorción de la estructura ósea de soporte alrededor de los dientes y mediada por una variedad de moléculas proinflamatorias, incluyendo TNF- α , IL-1 β , prostaglandina E2 y metaloproteinasas de la matriz (MMP) [Wegner, 2010]. De igual manera, se sugiere que la microbiota intestinal es un factor ambiental importante en el desarrollo de la AR, debido a que se ha observado una composición alterada de la microbiota en pacientes con AR temprana, principalmente aumento de las especies de *Prevotella* que contribuyen al desarrollo de artritis dependiente de células Th17 en modelos murinos (Maeda, 2019).

Otro factor ambiental bien definido es la exposición a cristales de sílice. Los individuos expuestos de manera crónica a este agente por ocupación de la industria minera, de cerámicas, vidrio o agricultura, tienen el doble de riesgo de desarrollar AR en comparación con sujetos con diferente ocupación [Ruiz-Esquide y Sanmartí, 2012]. Así mismo, se ha reportado una interacción entre la exposición a sílice y el tabaquismo en el desarrollo de AR con ACPA positivo, subrayan la importancia de considerar los factores ambientales en combinación [Stolt, 2009]. La asociación con otros factores ambientales como la dieta, el consumo de alcohol y el estatus socioeconómico permanecen poco claros [Liao, 2009; Lundsöm, 2009].

2.1.1.3 Factores hormonales

El papel que juegan las hormonas en el desarrollo de la AR se sustenta en diferentes hallazgos clínicos: la incidencia máxima de AR en mujeres coincide con la menopausia, cuando la producción de hormonas sexuales disminuye marcadamente [Islander, 2011]; el uso de anticonceptivos orales ejerce un efecto protector contra el desarrollo de la enfermedad [Hannaford, 1990; Doran, 2004] y el curso clínico e incidencia de AR se ve favorecido durante el embarazo [Silman, 1992; Ostensen, 2007; González, 2010].

Así mismo, las hormonas ejercen efectos inmunoreguladores específicos y dependientes de la dosis: como el cortisol y los andrógenos que suprimen la respuesta humoral y

celular; la progesterona y estrógenos que estimula la respuesta humoral e inhibe la respuesta celular, los estrógenos que estimulan la respuesta humoral y la prolactina que ejerce efectos inmunoestimuladores y linfoproliferativos tanto en la respuesta humoral como la celular. De esta manera, el perfil hormonal puede regular el sistema inmunológico mediante interacciones complejas [Buch, 2002; Oliver, 2009; González, 2010].

Adicionalmente, se han descrito alteraciones en el sistema inmuno-neuro-endocrino en pacientes con AR, pudiendo actuar como disparadores de la enfermedad o ser la consecuencia del proceso inmunológico inflamatorio crónico [Jara, 2006]. Se reportan niveles séricos de cortisol similares en pacientes con AR y controles, lo que sugiere una respuesta ineficiente de los pacientes para contrarrestar el ambiente proinflamatorio predominante. Por otro lado, los pacientes con AR tienen concentraciones séricas bajas de andrógenos y sus metabolitos, mientras que en algunos estudios reportan producción elevado de estrógenos en el líquido sinovial de pacientes con AR o hiperprolactinemia hasta de 30% de los pacientes, pudiendo potenciar el proceso inflamatorio de la enfermedad [Jara, 2011; Islander, 2011].

La relación entre prolactina y el sistema inmunológico ha sido demostrada en las últimas 3 décadas, ésta ejerce un papel importante en la respuesta inmune adaptativa e innata y es postulada como un participante en el desarrollo de autoinmunidad [Saha, 2009; Jara, 2011].

2.1.2 Epidemiología

La AR afecta entre el 0.5 y el 1% de la población general, aunque puede variar dependiendo de la región geográfica (Aletaha, 2010). Mientras que en Asia y África la prevalencia es de alrededor de 0.5%; en algunas poblaciones nativas americanas la prevalencia es mayor, en población Chipewa es del 6.8% y en indios Pima es del 5.3%. Estas variaciones sugieren la influencia de factores genéticos y ambientales en el desarrollo de AR [Gabriel y Michaud, 2009; Carmona, 2010]

La prevalencia global estimada de la AR en México es del 1.6%, pero existen grandes variaciones en diferentes áreas geográficas del país (Peláez-Ballestas, 2011). En el Sur

de México existe una mayor prevalencia de AR (2.81%) al igual que de hablantes nativos (40.13%), mientras que en el Noreste de México la prevalencia de AR fue menor de 0.77% y de hablantes nativos de sólo 0.4%. El uso de lenguas nativas ocurre en regiones de pueblos indígenas endogámicos, lo cual podría indicar una importante participación de los factores ambientales y genéticos, en el desarrollo de la AR [Moreno-Montoya, 2015].

La AR se presenta con mayor frecuencia entre los 40-55 años de edad; y afecta principalmente a las mujeres, con una proporción de 3:1, sin embargo, en pacientes con más de 75 años esta proporción se ve equilibrada [Oliver y Silman, 2009]. A nivel mundial es la principal enfermedad discapacitante, más de la mitad de los pacientes dejan de trabajar una década después del diagnóstico de la enfermedad. Aproximadamente del 40-50% de los pacientes con AR fallecen por complicaciones cardiovasculares. La esperanza de vida disminuye de 3-10 años dependiendo de la severidad de la enfermedad y la edad en que se presenta [Smolen y Aletaha, 2009; Carmona, 2010].

En México, Estados Unidos y Canadá, las enfermedades reumáticas ocupan el decimo lugar como causa de incapacidad total. En el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), la tasa de incapacidad laboral por enfermedades reumáticas se ha calculado en 1.38 por cada 1000 derechohabientes [Cardiel, 2011]. En Estados Unidos los costos específicos de la AR se estimaron en \$ 3.723 para todos los pacientes con AR que usaban cualquier régimen de tratamiento [Hresko, 2018].

2.1.3 Patología

La causa fundamental de la AR, dado su carácter autoinmune, es la pérdida de la tolerancia inmunológica frente a lo propio. Los mecanismos mediante los cuales ocurre esta pérdida de la tolerancia no se conocen, pero se considera que puede ser la interacción entre los factores de predisposición genéticos y ambientales. Estos promueven la pérdida de tolerancia a péptidos o proteínas citrulinadas encontrados en sitios extra-articulares como los pulmones, piel o cavidad oral [Holmdahl, 2014, Smolen, 2016]. Bajo el contexto de predisposición a la autoinmunidad, se da el escape de células B autoreactivas y puede iniciarse la producción de autoanticuerpos como el FR y los ACPA, incluso años antes de que aparezcan las manifestaciones clínicas de la

enfermedad (fase pre-articular) [Firestein, 2003; McInnes, 2011]. Posteriormente, un factor desencadenante como patógenos, daño mecánico o alteraciones neurológicas, puede iniciar la localización articular y el desarrollo de la sinovitis con las consecuentes manifestaciones clínicas (fase clínica) (Figura 2) [Smolen, 2018].

Los patógenos microbianos o virales pueden actuar como disparadores por diversos mecanismos: mimetismo molecular; daño tisular y liberación de autoantígenos secuestrados; activación de células espectadoras (*bystander*) debido a la inflamación persistente y producción de superantígenos que activarán a múltiples clones de células T [Sfriso P, 2010]. De manera similar, el trauma físico provocado por golpes, puede generar inflamación local y favorecer la liberación de antígenos secuestrados promoviendo la localización articular [Smolen, 2018].

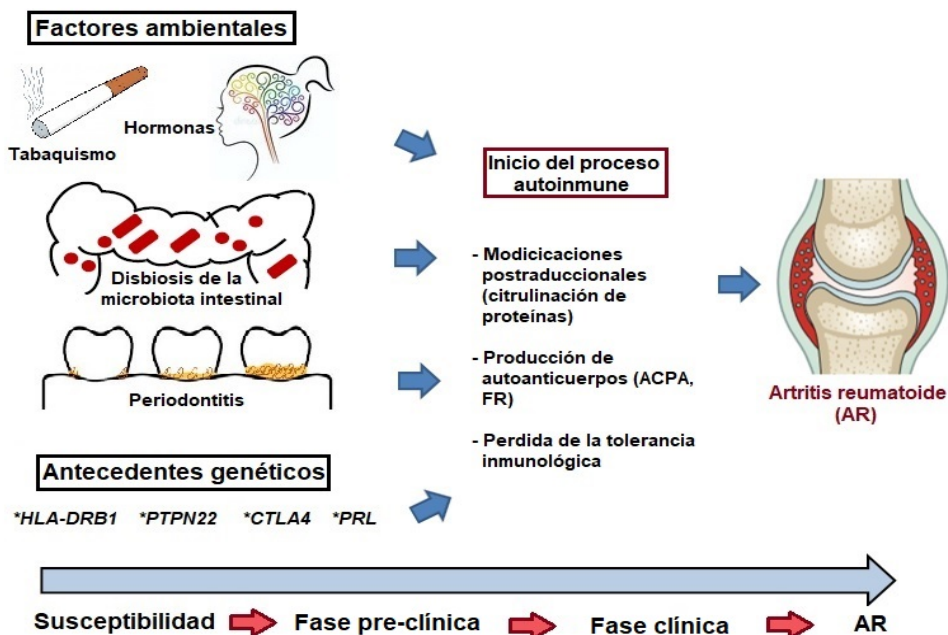


Figura 2 | Desarrollo y progresión de la AR. Los factores de riesgo genéticos y no genéticos promueven la pérdida de tolerancia inmunológica desencadenando la AR. La progresión de la enfermedad implica el inicio y la propagación de la autoinmunidad contra las proteínas propias modificadas, lo que puede ocurrir años antes del inicio de la sinovitis subclínica (inflamación de la membrana sinovial) y los síntomas clínicos. ACPA, anticuerpo contra proteínas citrulinadas; RF, factor reumatoide.

[Modificado de Maeda, 2019].

2.1.3.1 Patogénesis

Los mecanismos moleculares precisos que podrían ser responsables de la inmunidad contra la citrulina en los pulmones actualmente son desconocidos. Sin embargo, se conoce que la exposición pulmonar a agentes nocivos, incluido el humo, puede inducir una mayor expresión y activación de peptidil-arginina desaminasas (PADs). Este proceso posiblemente sigue al desencadenamiento de receptores tipo Toll (en particular TLR4) por partículas en el humo, partículas de sílice o agentes microbianos que están presentes en los pulmones de los fumadores. Se ha demostrado que dicha expresión aumentada de PAD (principalmente PAD4) está asociada con una mayor presencia de proteínas citrulinadas en tejidos de biopsia bronquial y células de lavado broncoalveolar tanto de pacientes con AR como de individuos sanos. También varios componentes del humo, así como el polvo de sílice y otros agentes nocivos, pueden contribuir a la acumulación y activación de varios tipos de células presentadoras de antígenos (APC) en los pulmones, incluidas las células dendríticas clásicas y las células B [Malmström, 2016].

Por lo tanto, es posible que la activación de la inmunidad mediada por células T se produzca por autoantígenos citrulinados (y otros modificados) en los pulmones después de la presentación de los neoantígenos por APC activadas localmente. Hasta la fecha, es desconocido si las células T reactivas con antígenos modificados postraduccionalmente inducidos por el medio ambiente escapan a la selección negativa en el timo [Malmström, 2016].

2.1.3.2 Respuesta inmune

Las células T CD4⁺ constituyen uno de los principales orquestadores de la respuesta inmunológica de la AR [Choy & Panayi, 2001]. Durante mucho tiempo se consideró como una enfermedad mediada por un predominio entre células Th1 con respecto a Th2. Sin embargo, la identificación de las células Th17 como nuevos subtipos celulares con potentes efectos inflamatorios y de las células T reguladoras (Treg) con efectos inmunosupresores, complementó el paradigma clásico de la AR, sugiriendo además un

desequilibrio entre células Th17 con respecto a Treg [Sarkar & Fox 2008; Niu, 2011; Bedoya, 2013].

Una cascada inflamatoria clave incluye la sobreproducción y la sobreexpresión de TNF. Esta vía impulsa la inflamación sinovial y la destrucción articular. La sobreproducción de TNF tiene varias causas, incluidas las interacciones entre los linfocitos T y B, los sinoviocitos, células dendríticas, células NK, neutrófilos y los macrófagos. Estas células desencadenan finalmente la generación de osteoclastos mediante el receptor activador del ligando del NFκB (RANKL) expresado en células T, células B y fibroblastos, con su receptor RANK en macrófagos, células dendríticas y preosteoclastos. El cartílago sufre daños por efectos catabólicos en los condrocitos después de su estimulación por citocinas. La matriz del cartílago se degrada mediante MMPs y otras enzimas. Las citocinas se unen a receptores afines para desencadenar diversos eventos de transducción de señales intracelulares, los intermediarios entre eventos extracelulares y la activación de una serie de genes que conducen o agravan la inflamación y el daño [Scott, 2010; Smolen, 2012; Smolen, 2016].

Las células B son de gran importancia en la AR debido a que son responsables de la producción de autoanticuerpos, tales como FR y ACPA. Estos anticuerpos forman complejos inmunes que se depositan en las articulaciones, activan al complemento y la producción de moléculas como C3a y C5a que contribuyen con el reclutamiento de más leucocitos hacia la articulación [Song & Kang 2009; Moura, 2012].

La unión de los ACPA a los osteoclastos induce la secreción de CXCL8, que promueve la quimioatracción de neutrófilos. Los neutrófilos a su vez también pueden migrar a las articulaciones en respuesta a estímulos inflamatorios inespecíficos. La quimiocina CXCL8 promueve que los neutrófilos liberen trampas extracelulares de neutrófilos (NET), que pueden potenciarse mediante la unión de ACPA a histonas citrulinadas expuestas en los NET. Además, la expresión de proteínas citrulinadas en el cartílago articular permite que los ACPA se unan a la superficie del cartílago e inicien la inflamación local a través de mecanismos mediados por el sistema inmune. Los ACPA también pueden unirse a las proteínas citrulinadas directamente en la membrana sinovial luego de pequeños traumas o infecciones. Los complejos inmunitarios entre proteínas citrulinadas (como fibrinógeno)

y ACPA-IgG pueden provocar inflamación (incluida la producción de IL-6 y factor de necrosis tumoral [TNF]), que son un sello distintivo de la inflamación sinovial en AR. Independientemente del evento iniciador, los cambios asociados con la inflamación articular transitoria normalmente pueden ser suficientes para permitir que los ACPA y RF ejerzan sus efectos proinflamatorios selectivamente en las articulaciones, donde la inflamación puede promover la expresión, así como la citrulinación de las proteínas. Como consecuencia, tanto los eventos dependientes de ACPA como los de RF podrían contribuir al inicio y la propagación de la inflamación sinovial crónica, y además sinergizar con

(Fig

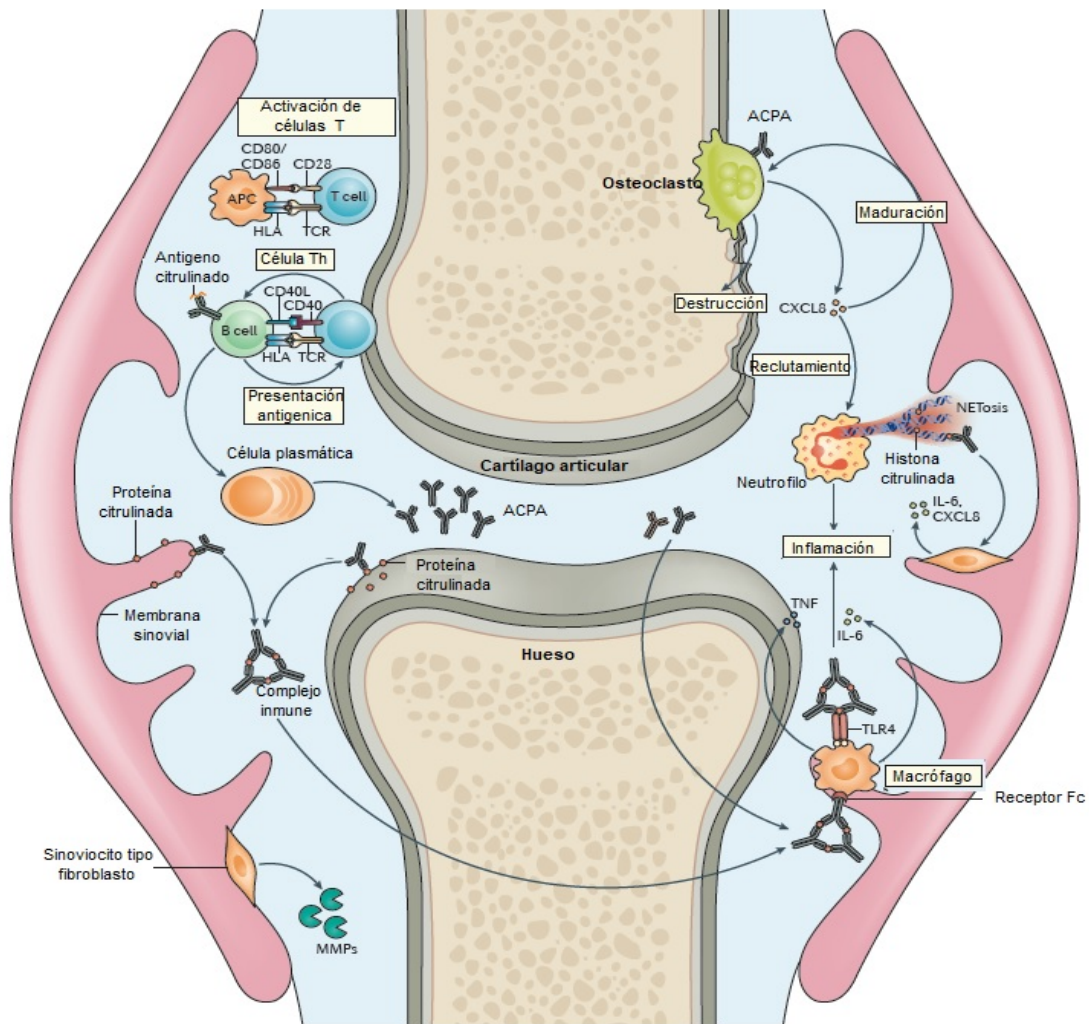


Figura 3 | Respuesta inmune de la AR.

En la membrana sinovial el sistema inmune innato y adaptativo interactúa para promover la remodelación tisular y daño. La retroalimentación positiva mediada por las interacciones que ocurren entre los leucocitos, fibroblastos sinoviales, condrocitos, y osteoclastos, junto con los

[Modificado de Malmstrom, 2016]

2.1.3.3 Autoanticuerpos

Las células B participan activamente en el proceso autoinmune a través de la interacción con las células T por una variedad de mecanismos, incluyendo la presentación antigénica, la producción de citocinas y de autoanticuerpos [Buch, 2002]. Los principales autoanticuerpos utilizados en el diagnóstico de la AR son el FR y ACPA, ambos están incluidos en los criterios de diagnóstico y clasificación para la AR emitidos en el 2010 [Aletaha, 2010]. Los anticuerpos ACPA son el resultado de una respuesta autoinmune específica generada contra péptidos citrulinados en los pacientes con AR, formados a partir de la citrulinación de proteínas (Song, 2010). El factor reumatoide (IgM e IgA) es el autoanticuerpo clásico en la artritis reumatoide, dirigidos contra el fragmento Fc de IgG [Scott, 2010]. La sensibilidad de ACPA (~ 67%) para AR es comparable a la inmunoglobulina (IgM) del FR (~ 69%) mientras que su especificidad (~ 95%) es más alta que la de IgM del FR (~ 85%) [Shi, 2015].

Así mismo, la vimentina es una proteína que puede ser citrulinada, por PAD4 ocasionando la producción de anticuerpos anti-vimentina. Adicionalmente existe la hipótesis de que cambios adicionales pueden influir en la antigenicidad de la vimentina, una mutación en la cual los residuos de glicina se reemplazan por arginina, lo que confiere propiedades antigénicas adicionales y da origen a la formación de anticuerpos contra vimentina citrulinada mutada (anti-MCV) [Gavrilă, 2015]. En general, presentan mayor sensibilidad (70-82%) y especificidad similar (85-98%) respecto a los anti-CCP [Al-Shukaili, 2012].

En 2011, se encontraron anticuerpos contra proteínas carbamiladas (anti-CarP) en el suero de pacientes con AR. En un estudio realizado en 2086 pacientes con AR temprana, se compararon anti-CarP, anti-CCP (generación II) y FR (IgM). Los resultados mostraron una sensibilidad del 44% y una especificidad del 89% para el anti-CarP, en comparación con la sensibilidad y especificidad anti-CCP del 54% y 96% respectivamente; mientras que el FR que tenían una sensibilidad del 59% y una especificidad del 91%. Los anticuerpos anti-CarP se dirigen a proteínas que sufren una modificación postraduccional llamada carbamilación. La carbamilación está mediada por cianato que principalmente modifica los residuos de lisina [Shi, 2015].

2.2 PROLACTINA (PRL)

2.2.1 Generalidades y funciones biológicas de la PRL

La prolactina (PRL) es una hormona que fue descubierta hace más de ochenta años, considerada durante mucho tiempo de origen exclusivamente hipofisiario y cuya función más importante era la estimulación y desarrollo de la lactancia de las glándulas mamarias. Fue identificada en 1932, y a pesar de ser estudiada durante muchos años, el conocimiento acerca de sus sitios de síntesis y sus funciones biológicas han incrementado ampliamente en las últimas décadas, reconociéndose su participación en múltiples mecanismos de homeostasis en el organismo entre los que destacan su papel inmunoregulator y su asociación con enfermedades de tipo autoinmune como la AR [Freeman, 2000; Méndez, 2005; Jara, 2011B].

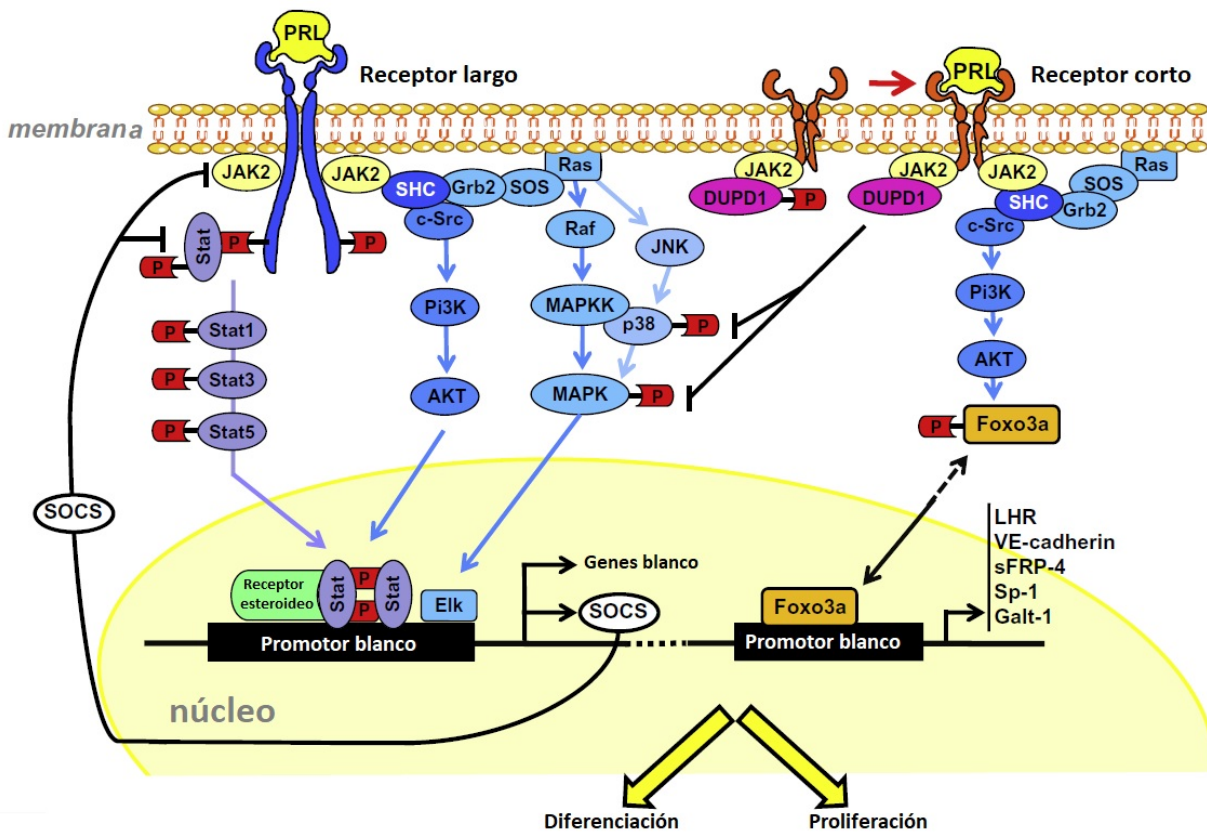


Figura 4 | Vía de señalización activadas por isoformas PRLR largas y cortas.

La activación inducida por el ligando de PRLR desencadena varias vías de señalización. La vía principal involucra a la tirosina cinasa Jak2, que a su vez activa a dos miembros de la familia Stat, Stat5 a y b. Las vías de MAPK y PI3K son otras vías importantes activadas por PRLR. Se ha descrito la activación de otras vías de señalización; entre estas, las Src cinasas que juegan un papel importante en la proliferación.

(Modificado de Bouilly et al., 2012)

2.2.2 Estructura de la PRL

La PRL es un péptido que consiste en aproximadamente 199 aminoácidos, compuesto de 4 hélices α (Figura 5) y su peso molecular es de 23 kDa, estabilizada por tres puentes disulfuro que se localizan entre los residuos de cisteína Cys⁴-Cys¹¹, Cys⁵⁸-Cys¹⁷⁴ y Cys¹⁹¹-Cys¹⁹⁹ [Keeler, 2003; Ben-Jonathan, 2008]. Existen otras isoformas de PRL las cuales incluyen una PRL grande de 56 kDa y una macro PRL de 150-160 kDa. La macro PRL es un compuesto tetamérico que es resultado de la polimerización con inmunoglobulinas que forman un complejo con la PRL. La PRL existe en diversas isoformas debido a diferentes modificaciones como splicing alternativo del transcrito primario y escisión proteolítica, donde sus productos son tres variantes: PRL de 14 kDa, 16 kDa y 22 kDa, entre otras modificaciones post-traduccionales [Brooks, 2012; Freeman, 2000; Orbach y Shoefeld, 2007; Teilum, 2005; Vaishya, Gupta y Arora, 2010; Costanza, 2015].

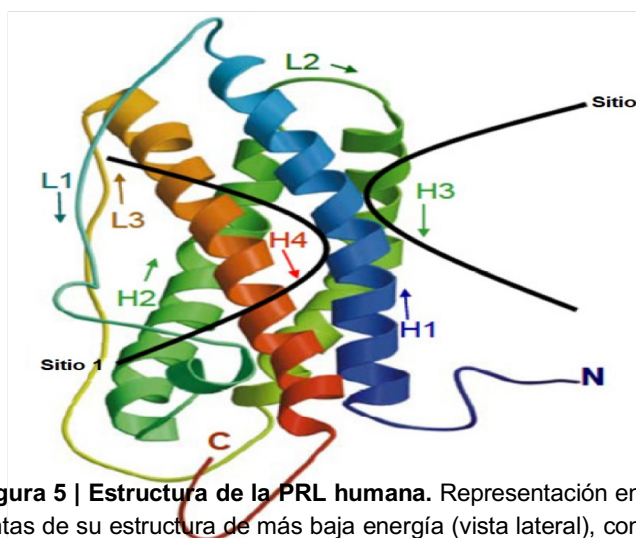


Figura 5 | Estructura de la PRL humana. Representación en cintas de su estructura de más baja energía (vista lateral), con las hélices

[Modificado de Ben-Jonathan, 2010]

2.2.2.1 Variantes estructurales de la PRL

La PRL es producida principalmente por células lactotropas de la glándula pituitaria anterior, en humanos, un promotor alternativo (también conocido como promotor superdistal o extrapituitario) impulsa la expresión de la PRL en varios sitios extrapituitarios, como inmune, decidual, mamario, epitelial y células grasas. El promotor superdistal se encuentra río arriba del promotor pituitario y genera una transcripción alternativa, 150 pb más larga que el mRNA pituitario clásico. También la PRL puede sufrir varias modificaciones postraduccionales, como la fosforilación y la glucosilación. La escisión proteolítica origina variantes de PRL [Freeman, 2000; Ben-Jonathan, 2008].

En circulación se han identificado 5 isoformas principales de PRL: la molécula clásica de 23 kDa; la forma glucosilada de 25 kDa; la variante de 16 kDa generada por corte proteolítico; los dímeros de 40-60 kDa (*big*-PRL) y la macroprolactina con un peso mayor a 100 kDa formada por complejos de prolactina monomérica con IgG (*big-big*-PRL). Además, algunas formas fosforiladas han sido caracterizadas en mamíferos, aunque no en humanos, así mismo, estas variantes de mayor peso molecular tienen menos actividad biológica que la PRL monomérica de 23 kDa [Smith y Norman, 1990; Sinha, 1995].

En general, las modificaciones post-traduccionales como la glucosilación y la polimerización, disminuyen la afinidad de unión al receptor de prolactina (PRL-R) por lo que tienen una menor actividad biológica *in vivo* [Sinha, 1995]. La variante generada por corte proteolítico de 16 kDa ha mostrado tener efectos antiangiogénicos [Corbacho, 2002].

2.2.3 Localización y regulación de la expresión del gen *PRL*

El gen de *PRL* está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (6p22.2-p21.3) y tiene una longitud aproximada de 18 Kb. Está constituido por cinco exones codificantes, un exón no codificante, y cuatro intrones (Figura 6) [Ben-Jonathan, 2008]. Estudios previos han encontrado un desequilibrio en el ligamiento (DL) del gen *PRL* con el gen HLA mismo que se ha asociado con AR y LEG. Este DL aumenta la posibilidad de que algunos SNP de *PRL* estén ligados con alelos de riesgo del HLA y en conjunto aumenten el riesgo de activación excesiva del sistema inmune y la predisposición genética a autoinmunidad [Stevens et al., 2001].

La transcripción del gen de *PRL* humana es regulada por dos regiones promotoras independientes; una región proximal que dirige la expresión específica en la glándula pituitaria, y una región superdistal que se encuentra río arriba del promotor pituitario que es responsable de dirigir la expresión en sitios extrapituitarios como el miometrio, tejido adiposo, próstata, glándula mamaria, y células del sistema inmunológico [Gerlo, 2006; Lee, 2009].

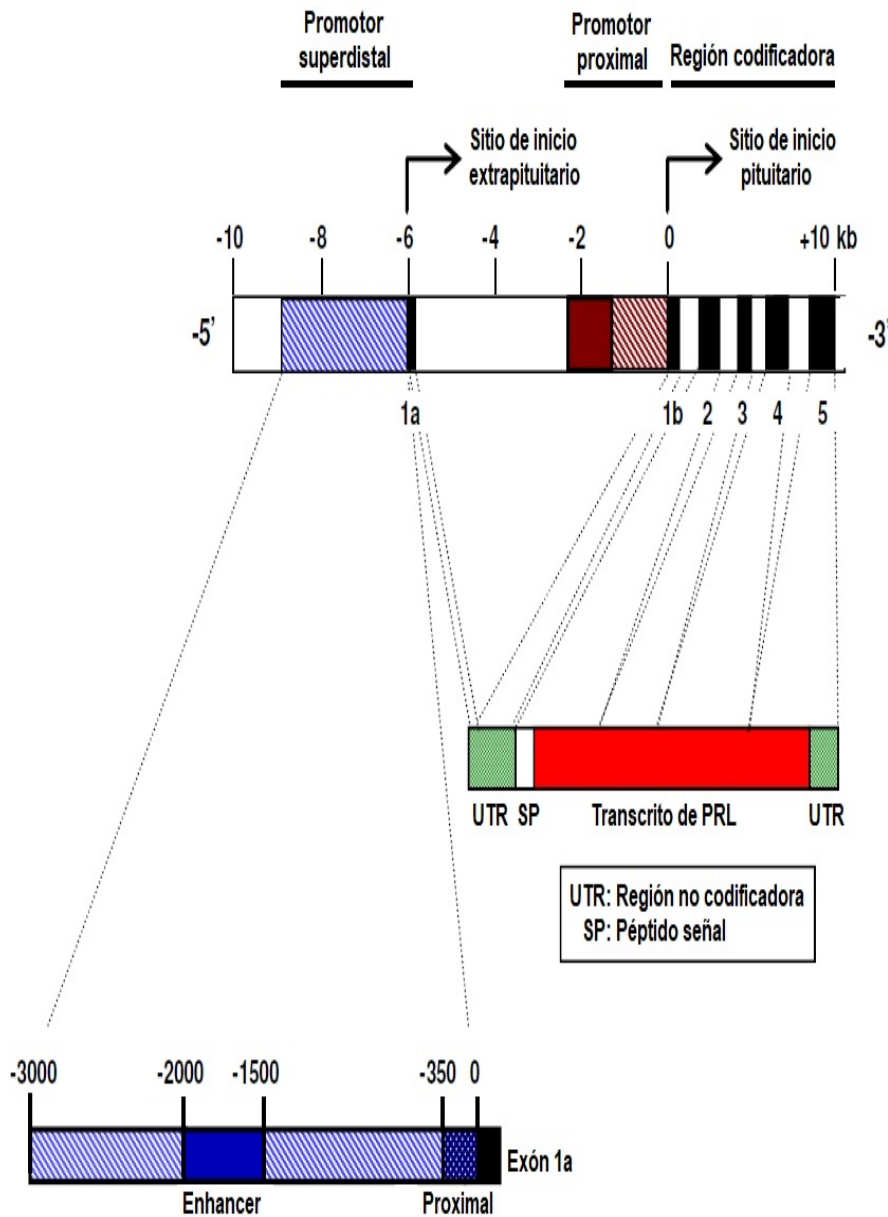


Figura 6 | Diagrama esquemático del gen *PRL* humano. El gen consta de cinco exones y cuatro intrones. Posee un promotor proximal y un promotor superdistal que regulan la transcripción pituitaria y extrapituitaria, respectivamente. [Modificado de Ben-Jonathan, 2010]

En los sitios de síntesis extrapituitaria, la transcripción del mRNA de *PRL* inicia en el exón no codificante (exón 1a), produciendo un mRNA con una región 5' no traducida (UTR, por sus siglas en inglés, *Untranslated Region*), pero cuya secuencia y función de la proteína es idéntica a la PRL sintetizada por la glándula pituitaria [Ben-Jonathan, 2008].

El cDNA de la PRL humana tiene una longitud de 914 nucleótidos y contiene un marco de lectura abierto de 681 nucleótidos que codifican para la pro-hormona de 227 aminoácidos. Durante el procesamiento, el péptido señal de 28 aminoácidos es eliminado por corte proteolítico, generando el polipéptido maduro de PRL de 199 aminoácidos, con un peso molecular de 23 kDa [Freeman, 2000].

La regulación transcripcional de *PRL* a nivel pituitario se da principalmente por la proteína Pit-1, debido a que el promotor proximal del gen de *PRL* contiene trece sitios de unión [Kishimoto, 2002]. Múltiples vías de señalización convergen en Pit-1 (estradiol, glucocorticoides, dopamina, PKA, PKC, Ras) y distintos complejos de coactivadores o corepresores interaccionan con este factor de transcripción regulando la expresión en la glándula pituitaria. Además, el promotor proximal de *PRL* posee una secuencia degenerada de elementos de respuesta a estrógenos (ERE), y a pesar de tener baja afinidad por el receptor de estrógenos α , puede promover la transcripción de *PRL* aunque de manera más sutil que el efecto observado en roedores [Ben-Jonathan, 2008; Gillam M, 2011].

La expresión de *PRL* en sitios extrapituitarios es regulada de manera tejido-específica. De forma general se ha determinado que no requiere de Pit-1 para su transactivación y que no es afectada por dopamina, neuropéptidos o estrógenos [Gellersen, 1994; Ben-Jonathan, 2008]. El promotor superdistal contiene sitios de unión para factores de transcripción como AP-1, C/EBP y CREB, pero dado que su regulación es diferencial, se desconocen en gran medida los ligandos que afectan la transcripción de *PRL* en cada sitio extrapituitario [Brandebourg, 2007; Gillam, 2011].

En leucocitos, el AMPc y sus análogos incrementan hasta seis veces la expresión de *PRL* al interactuar con elementos de respuesta al AMPc (CRE, por sus siglas en inglés, *cAMP Response Element*), mientras que en células Jurkat, la fitohemaglutinina induce la actividad transcripcional del promotor alterno [Reem, 1999; Van der Weerd, 2000].

2.2.4 La PRL como inmunoregulador

La PRL es una citocina que regula la maduración de células T CD4⁻ y CD8⁻ hacia células T CD4⁺ y CD8⁺ respectivamente, mediante la expresión del receptor de IL-2, el cual al interactuar con la IL-2 producida por células T conduce a la proliferación de células B y la síntesis de nuevos anticuerpos. Existe una correlación entre los niveles séricos de PRL con el número de células B y linfocitos T CD4⁺. Sin embargo, la PRL no es esencial para la linfopoyesis. No obstante, cabe destacar que los linfocitos T que se infiltran en la sinovia producen PRL y se ha demostrado que ésta aumenta la función de las células sinoviales en pacientes con AR [Orbach y Shoenfeld, 2007; Chuang y Molitch, 2007].

La PRL actúa como agente mitogénico y comitogénico (en conjunto con la IL-2 y fitohemaglutinina) en la proliferación de linfocitos T, linfocitos B y células NK mantenidas en cultivo. También está implicada en la diferenciación de células del sistema inmunológico: en concentraciones fisiológicas, promueve la diferenciación de monocitos a células dendríticas al inducir la síntesis de receptores para el factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF, por sus siglas en inglés *Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*), y aumenta la efectividad en la presentación del antígeno al inducir moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés *Major Histocompatibility Complex*) [Carreno, 2004]; en células NK la PRL promueve la respuesta LAK (actividad asesina inducida por citocinas) [Redelman, 2008]; en linfocitos T y B induce la transcripción del gen del factor regulador de interferón 1 (IRF-1, por sus siglas en inglés *Interferon Regulating Factor*) regulando su diferenciación y maduración, estimula la síntesis de IL-2 y sus receptores [Buckley, 2001] y promueve la síntesis de IFN- γ tanto en linfocitos T como en células NK [Yu-Lee, 2002; Méndez, 2005].

La PRL también actúa como mediador de la respuesta inmunológica e inflamación al estimular la síntesis de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS, por sus siglas en inglés *Inducible Nitric Oxide Synthase*) en granulocitos [Dogusan, 2001]. Así mismo, la PRL incrementa la supervivencia celular mediante la regulación de la expresión de genes implicados en la apoptosis (Bax y Bcl-2) y en la línea celular Nb2, es capaz de prevenir la apoptosis inducida por óxido nítrico y dexametasona [Hsu, 2006].

2.2.5 Papel de PRL en AR

La PRL se ha detectado en el líquido sinovial de la articulación de la rodilla y las células T que infiltran la membrana sinovial de los pacientes con AR secretan PRL [Chuang y Molitch, 2007; Orbach y Shoenfeld, 2007], que estimula la proliferación y producción de citocinas inflamatorias y metaloproteinasas de la matriz por las células sinoviales [Rovensky, 2005].

Se ha propuesto que la PRL está implicada en la incidencia incrementada de AR en mujeres que deciden amamantar durante el periodo postparto, debido a que coincide con niveles elevados de PRL [Barret, 2000; Østensen, 2007]. Además, se ha encontrado hiperprolactinemia (HPRL) en un 6 a 40% de pacientes con AR, así como en otras enfermedades autoinmunes como LEG (20-40%), esclerosis múltiple (13-59%) y síndrome de Sjögren (16-36%) [Jara, 2011B], lo que sugiere la participación de esta hormona-citocina en el desarrollo de autoinmunidad.

A pesar de las diferencias encontradas respecto a la frecuencia de HPRL, un estudio reportó que los niveles de PRL libre en pacientes con AR pueden encontrarse elevados de manera significativa, pero sin llegar a valores de hiperprolactinemia o macroprolactinemia [Ram, 2004]. Incluso un incremento moderado en las concentraciones de PRL puede tener implicaciones fisiológicas en la enfermedad; se ha descrito que concentraciones normales de PRL (20 ng/mL) inducen producción de IgG más efectivamente que concentraciones altas (100 ng/mL) en linfocitos de pacientes con LEG activo [Jacobi, 2001].

Así mismo, el incremento moderado o severo en los niveles circulantes de PRL en pacientes con AR podría ser afectado por la producción de PRL en tejidos extrahipofisarios; un estudio demostró que las células T que infiltran la sinovia de pacientes con AR producen PRL de manera local y el tratamiento *in vitro* de sinoviocitos tipo fibroblasto con PRL aumentó su proliferación y la producción de MMP-3 de manera dependiente de dosis [Nagafuchi, 1999]. En otro estudio realizado en ratas con artritis inducida por adyuvante, se encontró que las ratas con hiperprolactinemia muestran una mayor actividad y expresión en la sinovia de MMP-9, respecto a los grupos control [Gong YF, 2008].

Sin embargo, en diversos estudios se ha observado que, en las articulaciones, la PRL también puede desempeñar funciones protectoras y regenerativas. De hecho, la reducción de la tasa de formación ósea y la disminución de la densidad mineral ósea se han encontrado en ratones con deficiencia de PRLR. Se ha demostrado que la PRL inhibe la apoptosis de condrocitos *in vitro* inducida por inanición sérica, para aumentar la proliferación de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea sometidas a diferenciación condrogénica y para aumentar su síntesis de proteoglicanos y colágeno tipo II [Ogueta, 2002; Zermeno, 2006].

Por otro lado, se ha descrito un polimorfismo funcionalmente importante que altera la actividad del promotor extrapituitario de PRL y los niveles de mRNA en linfocitos, que ha sido asociado con enfermedades autoinmunes [Stevens, 2001].

2.2.6 Polimorfismo -1149 de PRL

Los polimorfismos genéticos son variantes en la secuencia del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y adquieren una frecuencia mayor al 1% tras múltiples generaciones. Estos constituyen la base de la evolución y cuando se consolidan pueden llegar a proporcionar ventajas a los individuos o en su defecto, contribuir a causar enfermedades [Inieta, 2004].

El polimorfismo -1149 se encuentra en la región promotora extrapituitaria del gen de *PRL* a 1149 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción en sitios extrapituitarios (número de acceso en *GeneBank*: AF068856) [Stevens, 1999], y corresponde a una sustitución de un solo nucleótido guanina por timina (G→T), la cual genera tres genotipos: el homocigoto silvestre G/G, el heterocigoto G/T y el homocigoto polimórfico T/T.

La importancia funcional de este polimorfismo se debe a que la sustitución altera el patrón de unión de factores de transcripción relacionados con la familia GATA (Figura 7), y el genotipo homocigoto GG se encuentra asociado con mayores niveles de mRNA de *PRL* en leucocitos circulantes [Stevens, 2001]. Los factores transcripcionales de la familia GATA están involucrados en la diferenciación de células Th2. El factor GATA-3 (el cual es el factor más abundante en células Th2) es un represor de la expresión de IFN- γ y se ha sugerido que tiene el mismo efecto sobre el gen *PRL* [Ferber, 1999].

El polimorfismo -1149 G>T ha sido estudiado en enfermedades de tipo autoinmunitario como LEG, AR y esclerosis múltiple, encontrándose asociado con LEG y AR en población europea [Stevens, 2001; Mellai, 2003; Fojtíková, 2007; Lee, 2009]. En población del Occidente de México, se determinó que el alelo -1149 T es un marcador genético de protección para AR, lo cual se asoció con títulos bajos de anticuerpos anti-CCP. Además, los homocigotos T/T se asocian con baja expresión del mRNA, lo cual sugiere influencia del genotipo T/T sobre el mRNA del gen de *PRL* [Reyes-Castillo, 2013]. Con base en lo anterior y considerando la diversidad en la ancestría en nuestro país resulta de interés determinar si existe asociación del polimorfismo -1149 G>T en pacientes con AR del Sur de México y si existe relación con la expresión de mRNA y niveles séricos de PRL.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La AR es una enfermedad autoinmune, crónica e inflamatoria, que afecta al 1.6% de la población en México y del 0.5 al 1% a nivel mundial, por lo que se considera una enfermedad frecuente y de interés clínico en esta población. Su principal factor de riesgo es genético, ya que se ha observado en el 60% de los casos. También se han asociado factores infecciosos como virus y bacterias, así como factores hormonales.

La prolactina es una hormona-citocina que ha sido asociada con diferentes enfermedades autoinmunes. En AR distintos hallazgos clínicos apoyan su posible papel en la patogénesis de la enfermedad; la incidencia de AR incrementa durante el periodo postparto, que coincide con niveles elevados de PRL en mujeres que se encuentran en lactancia, se observa HPRL en un porcentaje importante de pacientes con AR y puede ser producida en sitios extrapituitarios que incluyen a células del sistema inmunológico, sobre las que ejerce efectos inmunoestimuladores y linfoproliferativos. Además, estudios *in vitro* han evidenciado la producción de PRL por los linfocitos que infiltran la sinovia, así como la capacidad de PRL para estimular la producción de metaloproteinasas de matriz en células sinoviales promoviendo el daño articular.

La síntesis extrapituitaria de PRL es controlada por un promotor alternativo del gen, el cual contiene el polimorfismo -1149 G>T que puede afectar la expresión del mRNA. En población del Occidente de México, se determinó que el alelo -1149 T es un marcador genético de protección para AR, lo cual se asoció con títulos bajos de anticuerpos anti-CCP y baja expresión del mRNA, esto sugiere una influencia del genotipo TT sobre el mRNA del gen de *PRL*.

Con base en lo anterior y considerando la diversidad en la ancestría en nuestro país se planteó analizar la asociación del polimorfismo -1149 G>T en pacientes con AR del Sur de México con la expresión de su mRNA, los niveles séricos de PRL y las manifestaciones clínicas.

4. HIPÓTESIS

El polimorfismo extrapituitario -1149 del gen de *PRL* se asocia con una mayor expresión de *PRL* y con las variables clínicas en pacientes con AR del Sur de México.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la asociación del polimorfismo extrapituitario -1149 G>T de *PRL* con la expresión del mRNA y las variables clínicas en pacientes con AR del Sur de México

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar la frecuencia genotípica y alélica del polimorfismo -1149 de *PRL* en pacientes con AR y sujetos control (SC) del Sur de México
2. Cuantificar la expresión del mRNA de *PRL* en pacientes con AR y SC
3. Cuantificar los niveles séricos de PRL en pacientes con AR y SC
4. Evaluar la correlacionar los niveles séricos de PRL con las variables clínicas en AR

6. DISEÑO METODOLÓGICO

6.1 Tipo de estudio

Transversal-analítico (casos y controles).

6.2 Sede del estudio

El estudio se realizó en el Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas del Centro Universitario de Ciencias de Salud (CUCS) de la Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco; Servicio de Reumatología del Hospital General Raymundo Abarca Alarcón de Chilpancingo, Guerrero.

6.3 Consideraciones éticas

El proyecto se realizó de acuerdo a las normas y principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, establecidos en la declaración de Helsinki y que fueron revisados por última vez en la 59ª Asamblea General realizada en Seúl, Corea, en octubre de 2008 (Anexo 12.1).

La participación de los sujetos incluidos en el estudio fue de manera voluntaria, previa firma de carta de consentimiento informado (Anexo 12.2).

6.4 Universo de estudio

- Pacientes con AR clasificados de acuerdo a los criterios del ACR/EULAR 2010, que acudieron a la consulta del Servicio de Reumatología del Hospital General Dr. Raymundo Abarca Alarcón, Chilpancingo, Guerrero
- Sujetos control reclutados en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero y pacientes que acudan al laboratorio del Hospital General de Chilpancingo Guerrero

6.5 Periodo de estudio

De marzo de 2015 a febrero de 2018.

6.6 Tamaño de la muestra

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó con la siguiente fórmula de comparación de dos proporciones. Las frecuencias genotípicas (frecuencias de la exposición entre los casos y controles) utilizadas fueron las reportadas previamente en casos y controles (Reyes, 2013) y se obtuvo como resultado una muestra de 295 pacientes y 295 controles con una potencia de 80%.

$$n = \frac{\left[z_{1-\alpha/2} \sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

Donde:

n= Tamaño de la muestra

z= Error alfa del 5%

α = Área bajo la curva de distribución normal con nivel de significancia de 0.05

β = Coeficiente de confiabilidad

p1= La frecuencia de la exposición entre los casos

p2= La frecuencia de la exposición entre los controles

6.7 Selección de muestras

6.7.1 Criterios de inclusión

- Para el grupo de estudio:
 - Pacientes con AR, clasificados de acuerdo a los criterios del ACR/EULAR 2010
- Para el grupo control:
 - Individuos clínicamente sanos
- Para ambos grupos:
 - Individuos mexicanos, residentes del Sur de México (dos generaciones anteriores)
 - Participación voluntaria y firma de carta de consentimiento informado
 - Mayores de 18 años

6.7.2 Criterios de no inclusión

- Enfermedades reumáticas sobrepuestas
 - Embarazo*
 - Terapia hormonal de remplazo*
 - Tratamiento con fármacos que modifiquen las concentraciones de PRL: bromocriptina, L-dopa, derivados opiáceos, fenotiazinas, metoclopramida*
- *Criterios que aplican sólo para el estudio del mRNA y PRL sérica.

6.7.3 Criterios de exclusión

- Pacientes que no cuenten con expediente clínico
- Muestra sanguínea insuficiente
- Degradación o pérdida de la muestra

6.8 Unidades de observación

Suero y células procedentes de sangre periférica de pacientes con AR y de SC.

6.9 Variables

Variables independientes

- AR
- Polimorfismo -1149 en el gen de *PRL*

Variables dependientes

- Expresión de mRNA de *PRL*
- Concentración sérica de PRL
- Variables clínicas

6.10 Criterios de interpretación

- Polimorfismo -1149 del gen de *PRL*: GG \Rightarrow Dos bandas (280 y 58 pb), GT \Rightarrow Tres bandas (338, 280 y 58 pb), y TT \Rightarrow Una banda (338 pb)
- Cuantificación de la expresión del mRNA del gen de *PRL* reportado como veces de expresión (expresión relativa por el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$)
- Cuantificación de prolactina sérica en ng/mL

6.11 Definición y operacionalización de las variables

La Figura 7 muestra la relación entre las variables del estudio. Las definiciones conceptual y operacional de las variables se describen en la Cuadro 2.

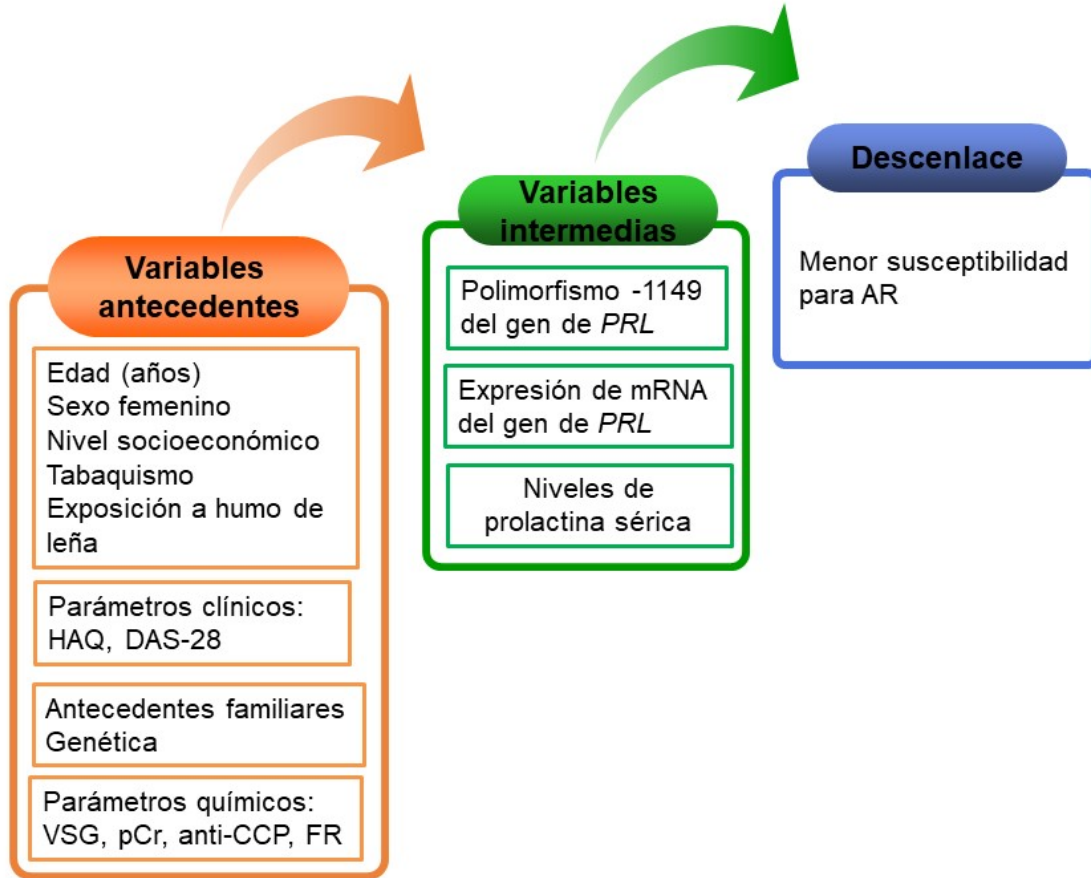


Figura 7 | Diagrama de relación de variables del estudio

Cuadro 2. Definición y operacionalización de las variables del estudio

Variables de estudio				
Variable	Definición conceptual	Unidades y/o categorías	Tipo de Variable	Forma de análisis
AR	Enfermedad que se caracteriza por inflamación crónica de las articulaciones	AR = ≥ 6 puntos en los criterios para AR (EULAR-ACR 2010)	Cualitativa	Frecuencias absolutas
Edad	Tiempo de vida transcurrido desde el nacimiento hasta la fecha de consulta	> 18 años	Cuantitativa continua	Medidas de tendencia central
Sexo	El hecho de ser hombre o mujer	Femenino Masculino	Cualitativa/dicotómica	Frecuencias absolutas
Estado civil	Condición de una persona en función de si tiene o no pareja	Soltero Casado Unión libre Divorciado Viudo	Cualitativa/politómica	Frecuencias absolutas
Ocupación	Actividad a la que se dedica una persona (empleo)	Ama de casa Empleado Desempleado	Cualitativa/politómica	Frecuencias absolutas
Tiempo de evolución de la enfermedad	Tiempo que ha transcurrido desde el diagnóstico de AR y la evaluación clínica	Años	Cuantitativa discreta	Medidas de tendencia central y dispersión.
Exposición a humo de leña	Está expuesta a humo de leña	Si No	Cualitativa nominal	Frecuencias absolutas
Índice de exposición a humo	Medición de la exposición acumulativa al humo de leña (No. años con exposición) (No. horas de exposición diarias)	Baja exposición < 100 Alta exposición > 100	Cuantitativa continua	Medidas de tendencia central y dispersión
Antecedentes familiares	Tiene familiares de primer grado que hayan tenido enfermedades autoinmunes	Si No	Cualitativa nominal	Frecuencias absolutas
Velocidad de sedimentación globular	La precipitación de los eritrocitos (glóbulos rojos) en un tiempo determinado (1 hora), miembro de los reactantes de fase aguda	Valores normales Hombres: < 15 mm/h Mujeres: < 20 mm/h	Cuantitativa continua	Medidas de tendencia central y dispersión
Proteína C reactiva	Producida en el hígado principalmente, miembro de los reactantes de fase aguda que aumentan durante los procesos inflamatorios	Valor normal < 5 mg/L	Cuantitativa continua	Medidas de tendencia central y dispersión
Factor reumatoide	Globulina anormal presente en el suero de las personas que padecen AR, LEG, etc.	< 30 mg/L = negativo > 30 mg/L = positivo	Cuantitativa continua	Medidas de tendencia central y dispersión
Anticuerpos anti-CCP	Niveles séricos de anticuerpos anti-CCP medidos por ELISA	≤ 5 U/mL = negativo > 5 U/mL = positivo	Cuantitativa continua	Medidas de tendencia central y dispersión
PRL	Determinación cuantitativa de PRL humana en suero por el método de ELISA	> 20 ng/mL	Cuantitativa continua	Medidas de tendencia central y dispersión

Metodología

HAQ	Cuestionario de evaluación la discapacidad laboral del paciente	0 = sin dificultad 1= con alguna dificultad 2= con mucha dificultad 3= incapaz de hacerlo	Cuantitativa continua	Medidas de tendencia central y dispersión
EVA	Escala visual análoga del dolor que permite evaluar la intensidad del dolor en una escala de 0-100	0-100	Cuantitativa discreta	Medidas de tendencia central y dispersión
DAS28	Evaluación de la actividad de la enfermedad con las escalas DAS28	Remision < 2.4 Actividad baja 2.7- 3.6 Actividad mod 3.7- 5.5 Actividad alta >5.5	Cuantitativa continua	Medidas de tendencia central y dispersión
SNP -1149 <i>PRL</i>	Polimorfismo de un solo nucleótido del gen <i>PRL</i> en la posición promotora -1149 G>T	0= G/G (dos bandas) 1= G/T (tres bandas) 2= T/T (una banda)	Cualitativa / politómica	Frecuencias absolutas, relativas y χ^2
Expresión de mRNA de <i>PRL</i>	Técnica de biología molecular (qPCR) mediante la cual se busca cuantificar el mRNA del gen de <i>PRL</i>	método $2^{-\Delta\Delta Cq}$	Cuantitativa	Medidas de tendencia central y dispersión

6.12 Diagrama general de la metodología

En la Figura 8 se muestra el esquema general de la metodología a realizar.

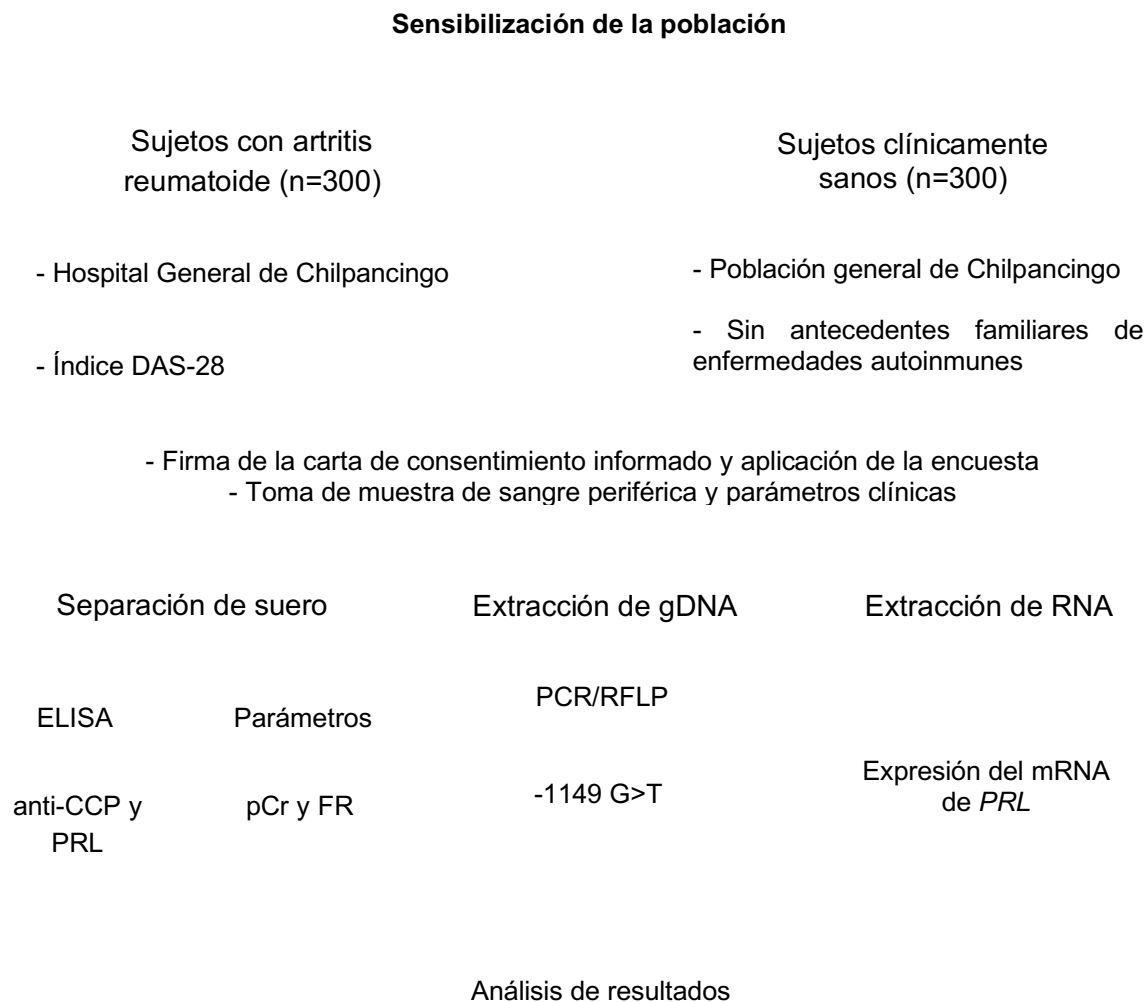


Figura 8 | Diagrama general de la metodología. El estudio consistirá de 2 fases: reclutamiento y evaluación clínica (realizado por un médico reumatólogo) y el análisis de las muestras.

6.13 Evaluación clínica

a) Examen físico general

Se realizó por el médico especialista, quien además realizó la historia clínica del paciente y aplicó los índices de discapacidad (HAQ) y de actividad de la enfermedad (DAS-28).

b) Parámetros clínicos

Los análisis clínicos fueron realizados en muestras de pacientes con AR y SC mediante por métodos automatizados en el Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas del CUCS, de la UdeG. Estos análisis incluyeron:

- Citometría hemática completa (CH), (CELL-DYN 1700R, Abbot Laboratories)
- FR, por turbidimetría (A25 Biosystems, España).
- Proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) por turbidimetría (A25 Biosystems, España).
- Velocidad de sedimentación globular (VSG), por el método de Wintrobe.

c) Índices de actividad y discapacidad funcional

Para medir el grado de actividad clínica y la discapacidad funcional de los pacientes con AR, se les aplicó los siguientes cuestionarios:

- DAS-28 (*Disease Activity Score*). Es un índice que permite medir la actividad de la enfermedad en pacientes con AR. Para su cálculo se consideran 4 variables: VSG; número de articulaciones inflamadas; número de articulaciones dolorosas (evaluando 28 articulaciones en total) y una escala análoga visual del dolor, posteriormente se aplica una fórmula matemática que brinda un puntaje de 0 a 10 (para su cálculo en línea: <http://www.das-score.nl/das28/en/>). Un valor mayor a 5.1 indica actividad alta de la enfermedad, un valor menor a 3.2 indica actividad baja, mientras que un valor menor a 2.6 indica remisión de la enfermedad (Anexo 12.3) [Van Riel, 2001].
- Spanish HAQ-DI (*Spanish Health Assessment Questionnaire Disability Index*). Este índice evalúa la función física de los pacientes con AR, utilizando un cuestionario que se responde en una escala ordinal que va desde “sin dificultad” hasta “no puedo hacerlo” (con valores de 0 a 3), la suma de valores se promedia entre el total de

reactivos y se obtiene una puntuación global, a mayor puntaje mayor discapacidad funcional (Anexo 12.4) [Bruce, 2005].

6.14 Análisis inmunológico

Para cuantificar los niveles séricos de PRL y anti-CCP en ambos grupos de estudio, se obtuvo suero partir de una muestra de sangre periférica. La sangre se recolectó en un tubo al vacío con gel de separación y se centrifugó 10 minutos a 3000 rpm (Hermle Z200A, Hermle Lab.), una vez separado el suero, se realizaron alícuotas en microtubos de 0.6 mL se etiquetaron y almacenaron a -80 °C hasta el día del ensayo.

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) descritos a continuación.

6.14.1 Cuantificación de PRL

Se realizó mediante una ELISA tipo sandwich (DRG, International; EIA-1291) que permite la determinación cuantitativa de PRL humana en suero con una sensibilidad de 0.35 ng/mL. Todas las corridas se realizaron con su respectiva curva de calibración por duplicado, siguiendo las especificaciones del proveedor (Figura 9).

Inicialmente, se reconstituyeron los estándares liofilizados (correspondientes a 0, 5, 20, 50, 100, 200 ng/mL) con un 1 mL de agua destilada, agitando vigorosamente hasta homogenizar.

Para la primera incubación, se colocaron 25 µL de los estándares y de las muestras de suero en los pozos de la placa, los cuales se encuentran cubiertos con un anticuerpo de captura, dirigido hacia un sitio antigénico de la molécula de PRL. Inmediatamente, se adicionaron 100 µL del conjugado enzimático [anticuerpo anti-PRL conjugado con peroxidasa de rábano (HRPO)], se mezcló vigorosamente por 10 segundos y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Transcurrido el periodo de incubación, se decantó el contenido de los pozos y se lavó 5 veces con agua destilada, para eliminar las moléculas no unidas a la placa.

Posteriormente, se añadieron 100 μL de solución sustrato [tetrametil bencidina (TMB)] a los pozos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. En este paso, el TMB fue oxidado por la enzima HRPO y se produjo un compuesto color azul.

Finalmente, se añadieron 50 μL de la solución de paro (H_2SO_4 0.5 M) a los pozos con el objetivo de estabilizar el cromógeno, produciendo finalmente una diimina color amarillo, cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de PRL en la muestra de suero.

La absorbancia de los pozos se determinó inmediatamente al terminar el protocolo en un lector de placas (Epoch, BioTek Instruments) a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados obtenidos fueron analizados con el software Gene 5 (BioTek Instruments); se promedió la absorbancia de los pozos corridos por duplicado y la curva de calibración se ajustó a un modelo de regresión logística de 4 parámetros.

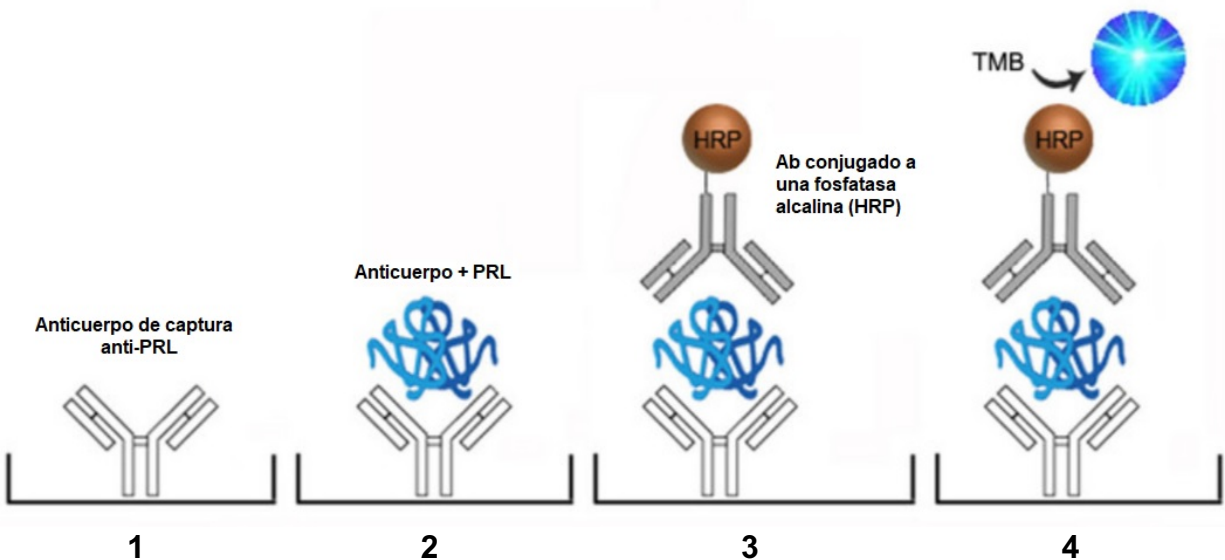


Figura 9 | Ensayo para la cuantificación de PRL. 1) Pocillo recubierto de anticuerpos monoclonales de captura dirigidos a PRL (anti-PRL). 2) Los anticuerpos monoclonales unidos a la PRL del suero problema. 3) Se añade el anticuerpo conjugado con HRP que se une a la PRL fijada al pocillo. 4) Se agrega el sustrato TMB que será oxidado por la enzima HRPO produciendo un compuesto color azul. Finalmente se añade la solución de paro para detener la reacción enzimática y realizar la lectura en el espectrofotómetro a 450 ± 10 nm. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de PRL en la muestra.

6.14.2 Cuantificación de anticuerpos anti-CCP

Se utilizó un ensayo comercial basado en un ELISA indirecto (Axis Shield, UK; FCCP400) que permite la detección de autoanticuerpos en suero humano dirigidos contra un péptido cíclico sintético que contiene residuos de arginina modificada. El protocolo se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones del proveedor y se describe brevemente a continuación:

Se realizaron diluciones 1:100 de las muestras y de los controles positivos y negativos. Así mismo, se reconstituyeron los calibradores para la curva de titulación (correspondientes a 0, 2, 8, 30, 100, 200 U/mL).

Se inició la primera incubación añadiendo 100 μ L de los calibradores, controles y muestras a los pozos de la placa recubiertos con el antígeno (péptido cíclico sintético purificado). Se incubó a 25°C durante 1 hora y transcurrido el tiempo, se lavaron los pozos 3 veces con la solución de lavado, para eliminar los componentes no fijados.

En la segunda incubación, se adicionaron 100 μ L de conjugado (anticuerpo anti-IgG ligado a fosfatasa alcalina) y se incubó a 25°C durante 30 minutos. En este paso, el anticuerpo conjugado se unió a los autoanticuerpos previamente fijados a la superficie, y los componentes no fijados se eliminaron de nuevo mediante 3 lavados con solución de lavado.

Posteriormente se añadieron 100 μ L de sustrato (monofosfato de fenoltaleína) a los pozos y se incubaron a 25°C durante 30 minutos. En este paso, la enzima desfosforilo a su sustrato produciendo un compuesto de color rosa-violeta.

Finalmente, se adicionaron 100 μ L de solución de paro (hidróxido de sodio) para estabilizar el cromógeno, y se midió la absorbancia después de 24 horas en un lector de placas (Epoch, BioTek Instruments) a 550 nm.

Los resultados fueron analizados con el software Gene 5 (BioTek Instruments), ajustando la curva de calibración a un modelo de regresión logística de 4 parámetros y multiplicando los valores de las muestras por su respectivo factor de dilución.

6.15 Análisis molecular

El análisis molecular incluyó el procedimiento experimental para la genotipificación del polimorfismo -1149 de *PRL* y la evaluación de la expresión del mRNA de *PRL*.

6.15.1 Extracción de DNA genómico

Se realizó con la extracción del DNA genómico (gDNA) a partir de leucocitos totales de sangre periférica mediante la técnica modificada de Miller [Miller, 1988]:

a) Obtención de leucocitos

Se colocó 3 mL de sangre periférica anticoagulada con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en un tubo cónico de 15 mL y se adicionaron 3 mL de TTS (1 mL triton X-100; 1 mL tris base 1 M pH 7.6; 30 mL sacarosa 1 M; agua destilada y desionizada estéril, c.b.p. 100 mL) (relación 1:1). Se agitó por inversión y se centrifugó a 3,000 rpm (Hermle Z200A, Hermle Lab.) durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y el botón se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se lavaron con 1 mL de TTS (2-3 veces) centrifugando a 12,000 rpm (Sorval Biofuge, Thermo Corp.) durante 2 minutos, hasta obtener un botón celular libre de eritrocitos.

b) Extracción del DNA genómico

Al botón celular se adicionaron 570 μ L de NaCl 5 mM y se homogenizó en vortex durante 2 minutos. Posteriormente, se agregaron 30 μ L de solución SDS al 10% (duodecil sulfato de sodio) y se homogenizó en vortex durante 10 minutos. Enseguida se adicionaron 200 μ L de solución saturada de NaCl, y se homogenizó en vortex por 15 minutos. Finalmente, se centrifugó a 11,500 rpm (Sorval Biofuge, Thermo Corp.) durante 25 minutos a 4°C y se observó la formación de 2 fases: una fase inferior color blanquecino (proteínas y membranas celulares) y una fase superior cristalina (contiene el DNA).

El sobrenadante superior se transfirió cuidadosamente a un tubo eppendorf estéril que contenía 500 mL de etanol absoluto frío (4°C) para evitar contaminación por proteínas; de inmediato se observó la formación de una hebra blanquecina (gDNA) y se dejó precipitar toda la noche a -20°C.

Al día siguiente, la hebra de gDNA se transfirió a un tubo eppendorf con 500 µL de etanol al 70% y se centrifugó a 9,000 rpm (Sorval Biofuge, Thermo Corp.) durante 10 minutos a 4°C. Este proceso de lavado se realizó 2 a 3 veces. Finalmente se decantó el etanol y el gDNA se dejó secar durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente.

Una vez evaporado el etanol, se agregaron de 300 µL de agua inyectable al botón de gDNA y se mezcló vigorosamente hasta homogenizar la solución. Posteriormente, las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) para su cuantificación y verificación de la calidad mediante la relación de DNA / proteínas (A260/A280), considerada aceptable en un rango de 1.5 a 2.0.

Finalmente se realizaron diluciones del gDNA para obtener una concentración final de 100 ng/µL y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.15.2 PCR-RFLP para la identificación del polimorfismo -1149 de *PRL*

Para la identificación de este polimorfismo se utilizó la técnica PCR-RFLP (por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*). En esta técnica, los fragmentos de DNA amplificados por PCR fueron sometidos a corte por una endonucleasa de restricción, la cual reconoce una secuencia nucleotídica de manera específica, y al existir cambio en alguna base por un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) se generó distintos patrones de fragmentos.

Para la amplificación del fragmento de interés con un tamaño de 338 pb, se utilizaron los siguientes iniciadores (Invitrogen Life Technologies) [Donn, 2002; Reyes-Castillo, 2013]:

Sentido: 5'-AGAATTGGAGTTCCAGTGCC-3'

Antisentido: 5'-ATCACACTCAACCAGTTGGC-3'

La mezcla de PCR se realizó con reactivos Invitrogen utilizando las siguientes concentraciones: solución amortiguadora 1X, iniciador sentido 0.04 µM, iniciador antisentido 0.04 µM, dNTPs 0.1 mM, MgCl₂ 4.0 mM, *Taq* polimerasa 0.6 U, gDNA 100 ng, agua destilada c.b.p. 25 µL.

La reacción de PCR se realizó en un termociclador (ESCO swift Max Pro) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos; 35 ciclos a 95°C, 58°C y 72°C durante 30 segundos; extensión final a 72°C durante 5 minutos.

Para corroborar que el fragmento de interés amplificó, se cargaron 5 µL del producto de PCR en un gel de poliacrilamida al 6% (relación acrilamida-bisacrilamida 29:1) con su respectivo marcador de peso molecular (50 pb, Invitrogen) y se corrieron en una cámara de electroforesis durante 50 minutos (180 V). Una vez finalizado el corrimiento, el gel se colocó durante 5 minutos en solución fijadora (100 mL alcohol, 5 mL ácido acético, agua destilada c.b.p. 1 L), se teñó con una solución de nitrato de plata al 2% durante 1 minuto y se dejó sumergido en solución reveladora (30 g NaOH, 5 mL formaldehído, agua destilada c.b.p. 1 L) hasta la aparición de las bandas. El fragmento amplificado que contiene el sitio polimórfico del gen *PRL* aparece como una banda de 338 pb.

Después de haber amplificado el fragmento de interés, se procedió a realizar su digestión utilizando la enzima *Apo I* (New England, BIOLABS). Esta reconoce la secuencia (R⁻AATTT) y realiza un corte en caso de presentarse una guanina. En el caso del genotipo homocigoto TT la enzima no reconoce el sitio de restricción y el fragmento de 338 pb permanecerá sin corte; en el genotipo GG la enzima corta generando dos fragmentos (280 y 58 pb); mientras que en el genotipo heterocigoto GT se visualizan tres fragmentos (338, 280 y 58 pb) (Figura 10).

Se utilizaron 0.3 µL (3 unidades) de enzima para digerir 5 µL de producto de PCR, en un tubo de reacción con 7 µL de solución amortiguadora NE (1X), 0.07 µL de BSA (0.1 µg/µL) y 0.93 µL de agua (volumen final de 7 µL). Los tubos de reacción fueron incubados en un termociclador (ESCO swift Max Pro) durante 1 hora a 50°C.

Finalmente, los productos de digestión fueron cargados en un gel de poliacrilamida al 6 % con su respectivo marcador de peso molecular (50 pb, Invitrogen), se corrieron durante 1 hora en la cámara de electroforesis (180 V) y se tiñeron y revelaron bajo las condiciones anteriormente descritas para el producto de PCR.

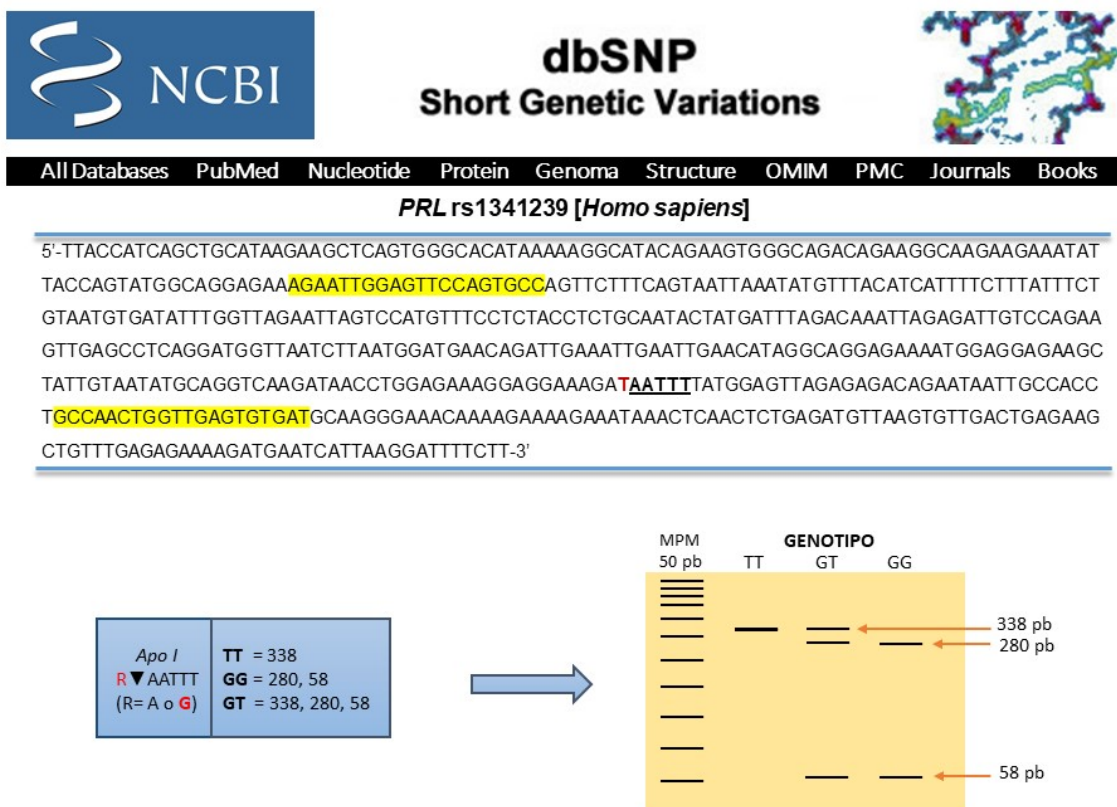


Figura 10 | Esquema general de la técnica PCR-RFLP. Los iniciadores sentido y antisentido que se utilizarán para la PCR se resaltan en color verde y el fragmento de 338 pb que se amplificará se muestra en color azul. Se muestra subrayado el sitio de reconocimiento de la enzima *Apo I*, y se resalta en color rojo el sitio polimórfico de cambio G T. En la parte inferior se muestran los patrones de restricción esperados para cada genotipo.

6.15.3 Secuenciación del fragmento polimórfico de *PRL*

Para validar la técnica PCR-RFLP y confirmar que los genotipos inferidos por esta técnica son correctos, se secuenciaron al azar muestras de cada genotipo (GG, GT, TT). Para ello, las muestras se amplificarán mediante PCR convencional en un volumen final de 50 μ L. Posteriormente, los amplicones se purificarán por cromatografía de filtración (Centri-Sep Spin, Princeton Separations, NJ) y se procedió a realizar la mezcla para secuenciación utilizando dideoxinucleótidos marcados con fluorescencia (Dideoxi Terminators; Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, ABI PRISM).

Las muestras se corrieron en un sistema de electroforesis capilar y la señal de fluorescencia fue detectada por el detector del equipo (Genetic Analyzer ABI Prism 310, Applied Biosystems). Finalmente, los electroferogramas fueron analizados utilizando el software Finch TV versión 1.4 (Geospiza, Inc.).

6.15.4 Extracción de RNA total

Para determinar la expresión del gen *PRL* fue necesario iniciar con la extracción de RNA total a partir de leucocitos totales de sangre periférica, utilizando el método modificado de Chomczynski y Sacchi [Chomczynski y Sacchi, 1987].

A los participantes en el estudio se les tomó una muestra de 5 mL de sangre periférica en un tubo al vacío con EDTA, y lo antes posible (1 hora como máximo) se inició con el proceso de extracción del RNA.

a) Obtención de leucocitos

Al tubo con 5 mL de sangre periférica se añadió directamente 1 mL de dextrán al 5% (Sigma Aldrich Co.) y se mezcló por inversión de 2 a 3 veces. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos, formándose una fase inferior con eritrocitos y una fase superior rica en leucocitos. La fase superior se transfirió a un tubo seco y se centrifugaron a 1,500 rpm (Hermle Z200A, Hermle Lab) durante 25 minutos. Se decantó el sobrenadante para dejar solamente un botón celular, que fue lavado de la siguiente forma: se agregó 1 mL de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma Aldrich Co.) y se mezcló con una pipeta durante 25 segundos e inmediatamente se añadió 1 mL de NaCl al 1.8% para recuperar la isotonicidad mezclando de nuevo durante 25 segundos, enseguida se centrifugó a 1,200 rpm (Hermle Z200A, Hermle Lab.) durante 15 minutos. El botón se lavó de 2 a 3 veces, según fuera lo necesario hasta quedar libre de eritrocitos.

b) Extracción de RNA total

Al botón limpio se añadieron 200 μ L de TRIZOL (Invitrogen) y se homogenizó hasta obtener una mezcla densa que se dejó reposar durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 40 μ L de cloroformo frío, se agitó manualmente durante 15 segundos y se dejó reposar 5 minutos. Se centrifugó a 10,000 rpm (Sorval Biofuge, Thermo Corp.) por 18 minutos a 4°C

para lograr la separación de 3 fases: una fase orgánica inferior rica en proteínas (color rosa), una interfase blanquecina que contiene el DNA y una fase acuosa superior que contiene el RNA. En esta última se separó cuidadosamente con una pipeta para evitar contaminación con DNA y/o proteínas y se transfirió a un microtubo con 100 μ L de isopropanol frío. El RNA se dejó precipitar toda la noche a -20°C .

Al día siguiente, se centrifugó a 10, 000 rpm (Sorval Biofuge, Thermo Corp.) durante 18 minutos a 4°C y el isopropanol se decantó cuidadosamente para no tirar el botón de RNA. Se lavó el botón (1 a 2 veces) con 200 μ L de etanol frío al 75% y se centrifugó de nuevo a 10, 000 rpm (Sorval Biofuge, Thermo Corp.) durante 18 minutos a 4°C . El sobrenadante se decantó y el tubo con el botón se dejó reposar durante 30 minutos en posición invertida sobre gasa estéril con el objetivo de evaporar el etanol restante.

El botón de RNA se reconstituyó con 10-15 μ L de H_2O -DEPC estéril y se determinó la concentración y pureza del RNA total mediante la lectura de su absorbancia a 260 nm para ácidos nucleicos y a 280 nm para proteínas (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). La relación A_{260}/A_{280} se consideró aceptable en un rango de 1.8 a 2, siendo 2 el valor ideal de una muestra pura de RNA. Las muestras se trataron con DNAsa, con el objetivo de eliminar al DNA de doble cadena y finalmente fueron etiquetadas y almacenadas a -80°C hasta su uso.

6.15.5 Transcripción reversa (RT)

Una vez obtenido y cuantificado el RNA total, se procedió a realizar la síntesis del DNA complementario (cDNA) mediante transcripción reversa. Esta técnica se realizó en tres etapas metodológicas:

- a) En un tubo plástico de 0.2 μ L se adicionó 1 μ g de RNA y 1 μ L de oligodT (Promega Corporation, USA) y se completó un volumen de 15 μ L con H_2O -DEPC. Esta mezcla se incubó a 70°C durante 5 minutos con el objetivo de hibridar las colas poli A del mRNA con los oligodT
- b) Al mismo tubo se le adicionaron 5 μ L de solución amortiguadora para RT (Promega Corporation, USA), 1.5 μ L de dNTPs (Promega Corporation, USA), 0.5 μ L de inhibidor de ribonucleasas (Promega Corporation, USA), 1 μ L de transcriptasa reversa M-MLV

(Promega Corporation, USA) y 2.25 μL de H_2O -DEPC para completar un volumen final de 25 μL . Se incubó a 42°C durante 1 hora. En este paso, la enzima transcriptasa reversa (RT) realizó la síntesis de las cadenas complementarias del mRNA (cDNA)

- c) Como último paso se adicionaron 0.5 μL de ribonucleasa H (Promega Corporation, USA) a cada tubo y se incubó durante 2 minutos a 37°C con el objetivo de eliminar el RNA intercalado que no se retrotranscribió

Finalmente se cuantificó el cDNA (NanoDrop 2000, Thermo Scientific) y se guardó a -20°C hasta su uso para PCR en tiempo real.

6.15.6 PCR cuantitativa en tiempo real

Una vez obtenido el cDNA de las muestras, se procedió a evaluar la expresión del gen de *PRL* mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*).

Como química de detección se utilizaron sondas de hidrólisis (sondas *TaqMan*, Applied Biosystems). Estas son oligonucleótidos que hibridan específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener y se encuentran marcadas con un fluorocromo donador (*reporter*) en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado, y un aceptor (*quencher*) en el extremo 3' que reduce la fluorescencia emitida por el donador cuando ambos se encuentran cercanos (mientras la sonda está intacta). Durante la extensión del DNA blanco, la polimerasa hidroliza a la sonda mediante su actividad exonucleasa 5' y provoca la separación del donador, lo cual genera emisión de fluorescencia que es captada por un lector en el equipo y se relaciona con la cantidad de amplicón producido.

Los ensayos de expresión para el gen de interés *PRL* y para el gen constitutivo gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), se obtuvieron de la plataforma de Applied Biosystems (ID Hs01062137_m1/FAM y Hs03929097_g1/VIC, respectivamente). Las muestras fueron analizadas en el equipo Light Cycler Nano (Roche, Applied Science) y su expresión fue evaluada utilizando el valor del ciclo de cuantificación (Cq) definido como el ciclo en el que la fluorescencia es significativamente más alta que la fluorescencia de fondo y se relaciona inversamente con la cantidad inicial de cDNA presente en la muestra.

La expresión relativa del mRNA de *PRL* se obtuvo utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ realizando una previa validación, según lo sugerido por Livak [Livak, 2001], con el objetivo de verificar que las eficiencias de amplificación del gen de interés y de referencia son similares.

Los valores se obtuvieron a partir de las siguientes fórmulas:

$$\Delta Cq = (Cq_{\text{promedio de } PRL} - Cq_{\text{promedio de } GAPDH})$$

$$\Delta\Delta Cq = (\Delta Cq - \Delta Cq_{\text{calibrador}})$$

Siendo utilizado como calibrador el ΔCq promedio de sujetos control o el ΔCq promedio de los portadores del genotipo GG, según el análisis correspondiente.

Las mezclas de reacción se llevaron a cabo en tubos ópticos para qPCR de 0.2 mL (LightCycler 8-tube strips clear, Roche Diagnostics); a cada tubo se adicionaron 7.5 μL de mix (AmpliTaQ Gold Master Mix, Applied Biosystems), 0.8 μL de la sonda respectiva (*PRL* ID Hs01062137_m1 ó *GAPDH* ID Hs03929097_g1, Applied Biosystems), 2 μL de cDNA y 4.7 μL de agua (H_2O grado PCR, Roche Diagnostics) para completar un volumen final de 15 μL . Las muestras fueron realizadas por triplicado bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de 45 ciclos que incluirán calentamiento a 95°C durante 15 segundos y alineación + extensión a 60°C por 1 minuto.

6.16 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con los paquetes STATA v11.0, Excel 2009 y GraphPad Prism v5.0. Todas las pruebas fueron consideradas estadísticamente significativas si presentaron un valor de $p < 0.05$.

- Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk a todas las variables cuantitativas con la finalidad de verificar si los datos tenían una distribución simétrica
- Las variables cuantitativas con distribución simétrica se presentaron como media y desviación estándar, y para las comparaciones entre grupos se utilizaron la prueba de *t-Student* (dos grupos) o ANOVA (más de dos grupos)

- Las variables cuantitativas con distribución asimétrica se presentaron como mediana y percentiles (25-75), y para las comparaciones entre grupos se utilizaron la prueba de Mann-Whitney (dos grupos) o Kruskal Wallis (más de dos grupos)
- Para las variables cualitativas se determinaron frecuencias absolutas y las diferencias entre las proporciones se calcularon mediante la prueba de χ^2 .
- Las frecuencias genóticas y alélicas se realizaron por conteo simple en ambos grupos. El equilibrio génico se realizó en el grupo de los sujetos control mediante la prueba del equilibrio de Hardy Weinberg. Para determinar diferencias entre las proporciones y el grado de asociación se utilizaron: razón de momios (*OR, del inglés odds ratio*), intervalos de confianza al 95% y la prueba de χ^2 .
- La correlación entre dos variables fue determinada por el coeficiente de correlación de Pearson (en las que presentan una distribución simétrica) o de Spearman (para las variables que tuvieron una distribución asimétrica)

7. RESULTADOS

7.1 Características demográficas de los pacientes y controles

Los pacientes fueron diagnosticados de acuerdo los criterios del 2010 del ACR/EULAR por un médico especialista en reumatología en el Hospital General de Chilpancingo Dr. Raymundo Abarca Alarcón. Los sujetos control fueron reclutados en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro). Para evitar la heterogeneidad de la población, sólo se incluyen sujetos no emparentados entre sí y mexicanos mestizos con antepasados mexicanos de al menos tres generaciones del Sur de México.

La población en estudio se encuentra conformada por un total de 300 pacientes con AR y 300 SC. Los datos demográficos de los pacientes con AR y SC se muestran en el Cuadro 3. La edad media en el grupo de pacientes con AR fue de 46 años y en los SC de 47 años, de los cuales la mayor proporción fue del género femenino con un 93% para ambos grupos. Con respecto a los factores de riesgo, sólo el 10% de los pacientes refirió el hábito del tabaquismo, este factor ha sido fuertemente asociado con AR en otras poblaciones. Mientras que el 66% de los pacientes están expuestos al humo de leña, este factor recientemente se ha visto asociado con la AR, por lo cual, podría ser considerado como un factor de riesgo importante.

La mayor proporción de pacientes se encontró con actividad moderada de la enfermedad (DAS28: media = 3.32), y no presentan alguna discapacidad funcional para realizar cualquier actividad diaria (HAQ-DI: mediana = 0.28), de manera independiente al tiempo de evolución de la enfermedad que fue de 6 años. Sin embargo, se observó que apesar del tiempo de evolución sólo el 29% de los pacientes presentaban erosiones oseas.

Por otra parte, los pacientes fueron clasificados de acuerdo al tiempo de evolución en AR temprana (< 2 años) y AR establecida (> 2 años) tomando como referencia la aparición de la primera manifestación clínica de la enfermedad y se observó que la AR establecida es la más frecuente en nuestra población (75%).

Cuadro 3. Características demográficas y clínicas de los pacientes con AR y SC

Características	AR (n=300)	SC (n=300)	P
Demográficas			
Edad (años) ^a	46 (25-70)	47 (27-71)	0.319
Genero % (n)			
Masculino	7 (22)	9 (28)	0.369
Femenino	93 (278)	91 (271)	
Tabaquismo % (n)	10 (31)	19 (37)	0.009
Exposición a humo de leña % (n)	66 (197)	33 (65)	<0.001
Baja exposición (<100 hrs/años)	75 (147)	-	
Alta exposición (≥100 hrs/años)	25 (50)	-	
Evaluación clínica			
Evolución de la enfermedad (años) ^a	6 (1-23)	-	
AR temprana (< 2 años)	25 (75)		
AR establecida (≥ 2 años)	75 (225)		
Artritis	44 (132)	-	
Artralgias	47 (141)	-	
Erosiones articulares	29 (88)	-	
DAS28 ^a	3.32 (1.99-7.63)	-	
DAS28 % (n)			
Remisión (<2.6)	22 (66)	-	
Actividad baja (≥2.6 <3.2)	24 (71)	-	
Actividad moderada (≥3.2 <5.1)	32 (96)	-	
Actividad alta (≥5.1)	22 (67)	-	
HAQ-DI, 0-3 ^a	0.28 (0-1.6)	-	

^a mediana y percentiles (p5-p95). Los valores de *p* se calcularon mediante la prueba de X² o la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney, según sea apropiado. RA, artritis reumatoide; SC, los sujetos de control; DAS28, índice de actividad de la enfermedad 28; HAQ-DI, versión española del cuestionario de evaluación de salud.

Con relación a los parámetros de laboratorio (reactantes de fase aguda y autoanticuerpos) y al tratamiento los resultados se muestran en el Cuadro 4. Los reactantes de fase aguda (VSG y pCr) y autoanticuerpos (FR, anti-CCP y antiMCMV) se encontraron significativamente más elevados en el grupo de pacientes con AR en comparación al grupo de SC (*p* <0.001). El valor de corte de positividad para los anticuerpos anti-MCMV fue de 20 U/mL, para los anti-CCP de 5 U/mL y para el FR de 30 U/mL.

En cuanto al tratamiento, los pacientes fueron tratados principalmente con fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad (FARMEs) entre estos metotrexate con un 65%, glucocorticoides y fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (AINE), ya sea como monoterapia o politerapia. No obstante, un 32% de los pacientes se encontraba sin tratamiento, debido a un reciente diagnóstico o por abandono del tratamiento.

Cuadro 4. Parámetros de laboratorio y tratamiento de los pacientes con AR y SC

Características	AR (n=300)	SC (n=300)	P
Parámetros de laboratorio			
VSG (mm/h) ^a	30 (10-55)	27 (6.5-46.5)	<0.001
CRP (mg/L) ^a	14.7 (3.6-115.1)	10.7 (2.5-46)	<0.001
FR (UI/mL) ^a	160.46 (4.4-300)	0 (0-15)	<0.001
FR % (n)			
Negativo (<20 UI/mL)	11 (26)	96 (192)	<0.001
Positivo (≥20 UI/mL)	89 (203)	4 (8)	
anti-CCP (U/mL) ^a	98.5 (1-900)	0 (0-3)	<0.001
anti-CCP % (n)			
Negativo (<5 U/mL)	9 (27)	95 (142)	<0.001
Bajo positivo (≥5.1-14.9 U/mL)	8 (23)	2 (3)	
Alto positivo (≥15 U/mL)	83 (250)	3 (4)	
anti-MCV (U/mL)			
anti-MCV % (n)	141 (8-1000)	-	
Negativo (<20 U/mL)	15 (26)	-	
Bajo positivo (≥20-59.9 U/mL)	20 (35)	-	
Alto positivo (≥60 U/mL)	65 (115)	-	
Tratamiento % (n)			
AINEs	56 (168)	-	
Glucocorticoides	44 (131)	-	
FARMEs			
Azulfidina (Sulfasalazina)	15 (45)	-	
Cloroquina	39 (118)	-	
Metotrexate	65 (196)	-	
Sin tratamiento	32 (96)		

^a mediana y percentiles (p5-p95). Los valores de *p* se calcularon mediante la prueba de X² o la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney, según sea apropiado. RA, artritis reumatoide; SC, los sujetos de control; VSG, velocidad de sedimentación globular; CRP, proteína C reactiva; FR, factor reumatoide; anti-CCP, anticuerpos contra péptidos citrulinados cíclicos; anti-MCV, anticuerpos contra vimentina citrulinada mutada; AINES, medicamentos antiinflamatorios no esteroideos; FARMEs, medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad..

7.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo -1149 G>T en el gen *PRL*

Para determinar el equilibrio génico de Hardy-Weinberg del SNP -1149 G>T del gen *PRL* se analizaron las frecuencias genotípicas del grupo de sujetos control originarios del Sur de México. Se observaron diferencias significativas entre las frecuencias observadas y esperadas (*p*=0.002), lo cual indica que la población seleccionada no se encuentra en equilibrio (Cuadro 5).

Cuadro 5. Determinación del Equilibrio de Hardy-Weinberg para el SNP -1149 G>T en el gen *PRL*

Genotipos	Valores observados	Valores esperados	χ^2	p^*
GG	242	236	9.635	0.002
GT	48	60		
TT	10	4		
Total	300	300		

*valor de p calculado con prueba exacta de Fisher

Para inferir la causa de la desviación del equilibrio se realizaron los estadísticos F de Wright (F_{is} y F_{st}), con los cuales se evalúan el coeficiente de endogamia y el grado de diferenciación genética entre poblaciones, respectivamente (Wright, 1949). Para nuestro análisis se calculó el valor de F_{st} tomando como referencia las frecuencias de heterocigocidad del polimorfismo -1149 G>T reportadas en población del Centro de México (Montoya *et al.*, 2011) y del Occidente de México (Reyes *et al.*, 2013). El valor de F_{st} obtenido fue de 0.32, el cual nos indica que en la población del Sur de México existe una divergencia genética muy grande con respecto a las antes descritas. Por otra parte, el valor de F_{is} fue de 0.4, señalando que la divergencia observada se debe a procesos de endogamia, lo cual es apoyado debido a que se observó un número de homocigotos mayor al esperado (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de divergencia genética y endogamia en regiones de México

Autor y año	n	Región	FA	He	Fst	Fis
Montoya <i>et al.</i> , 2011	138	Centro de México	0.030	0.2500		
Reyes <i>et al.</i> , 2013	333	Occidente de México	0.230	0.3870		
Gómez <i>et al.</i> , 2015	160	Sur de México	0.110	0.1500	0.32	0.4

Interpretación Fst: (divergencia genética), 0-0.05 = baja; >0.05-0.15 = moderada; >0.15-0.25 = grande; >0.25 = muy grande. **Interpretación Fis:** Si es 0 no hay endogamia y la población está en equilibrio de Hardy Weinberg. Cuando el valor es negativo, significa que hay un exceso de heterocigotos y si es positivo que hay un exceso de homocigotos. FA, frecuencia del alelo polimórfico; He, frecuencia de heterocigotos.

7.3 Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -1149 G>T en el gen *PRL* en pacientes con AR y SC

La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas del SNP -1149 G>T del gen *PRL* en 300 pacientes con AR y 300 SC se muestra en el Cuadro 7. Se realizó la comparación

de las frecuencias genotípicas y alélicas entre ambos grupos de estudio y se encontraron diferencias significativas en la distribución genotípica y alélica ($p < 0.05$) del SNP -1149 G>T del gen *PRL*. Asimismo, se analizó la distribución del polimorfismo aplicando los modelos genéticos de herencia dominante y recesiva. De acuerdo al modelo genético dominante se observó una asociación entre el alelo T (grupo GT+TT) y un efecto protector en los portadores de estos genotipos (OR 0.09, 95% IC (0.002-0.69); $p = 0.006$).

Cuadro 7. Distribución del SNP -1149 en el gen *PRL* entre pacientes con AR y SC

SNP -1149 G>T	SC n=300 n(%) ^a	AR n=300 n(%) ^a	OR (IC 95%)	<i>p</i> [*]
Genotipo				
GG [‡]	242 (81.7)	265 (88.4)	1.0	
GT	48 (16.0)	34 (11.3)	0.65 (0.39-1.06)	0.069
TT	10 (3.3)	1 (0.3)	0.09 (0.002-0.65)	0.005
Alelo				
G [‡]	532 (89)	564 (94)	1.0	
T	68 (11)	36 (6)	0.50 (0.32-0.77)	0.001
Do				
GG [‡]	242 (80.7)	265 (88.3)	1.0	
GT+TT	58 (19.3)	35 (11.7)	0.55 (0.33-0.89)	0.010
Re				
GG+GT [‡]	290 (96.7)	299 (99.7)	1.0	
TT	10 (3.3)	1 (0.3)	0.10 (0.002-0.69)	0.006

^aDatos proporcionados en n y porcentajes. AR, artritis reumatoide; SC, sujetos control; Do, modelo genético dominante; Re, modelo genético recesivo. ^{*}Valor de *p* calculado por χ^2 . [‡]Categoría de referencia. [§]Valor de *p* calculado por regresión logística.

7.4 Asociación del SNP -1149 G>T en el gen *PRL* con características clínicas en AR

Los parámetros clínicos y el índice de actividad de la enfermedad fueron comparados de acuerdo al modelo genético dominante para el SNP -1149 G>T (Cuadro 8). Se observó que los portadores del genotipo GG presentaban tendencia a mayores niveles de FR (168 UI/mL vs. 137 UI/mL) y anti-MCV (143 U/mL vs. 88 U/mL) en comparación con los portadores del alelo T (GT+TT). Mientras que los portadores del alelo T presentaron mayor tiempo de evolución que los portadores del genotipo GG (6 vs 8 años). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

Cuadro 8. Parámetros clínicos, índices de actividad y discapacidad en pacientes con AR de acuerdo al modelo genético dominante del SNP -1149 G>T en el gen PRL

Variable	GG (n = 265)	GT+TT (n = 35)	p ^a
Evaluación clínica^a			
Tiempo de evolución	6 (1-22)	8 (1-23)	0.39
DAS-28	3.32 (2.02-7.55)	3.38 (1.74-8.41)	0.95
HAQ	0.28 (0-1.59)	0.27 (0-1.61)	0.66
VSG (mm/hr)	30 (10-55)	32 (10-56)	0.86
pCr (mg/dL)	14.9 (3.8-120)	14.6 (3.6-71.5)	0.40
PRL (ng/mL)	11.2 (5.8-25.0)	10.8 (6.5-24.1)	0.87
Artritis ^b	46	51	0.55
Artralgias ^b	49	54	0.59
Autoanticuerpos			
Anti-CCP U/mL ^a	98 (1-900)	99 (4-900)	0.99
Negativos % ^b	10	6	
Bajos Positivos % ^b	7	11	0.55
Altos Positivos % ^b	83	83	
Anti-MCV U/mL ^a	143 (7-1000)	88 (11-1000)	0.41
Negativos % ^b	14	18	
Bajos Positivos % ^b	20	24	0.84
Altos Positivos, % ^b	66	59	
FR UI/mL ^a	168 (4.4-300)	137 (10.4-507)	0.25
Negativos, % ^b	12	8	
Bajos Positivos, % ^b	14	19	0.66
Positivos, % ^b	74	73	

^aDatos proporcionados en medianas (p5-95); prueba U de Mann-Whitney. ^bDatos proporcionados en porcentajes; prueba exacta de Fisher. **Abreviaturas:** VSG, velocidad de sedimentación globular; pCr, Proteína C reactiva de alta sensibilidad; PRL, prolactina; Anti-CCP, anticuerpos contra-péptido citrulinado cíclico, Anti-MCV, anticuerpos contra vimentina citrulinada mutada; FR, factor reumatoide; DAS-28, *Disease Activity Score 28*.

7.5 Niveles séricos de PRL en pacientes con AR y SC

La cuantificación de los niveles séricos de PRL se realizó en 100 mujeres con AR y 100 mujeres SC pareadas por edad. Al comparar los niveles solubles de PRL entre pacientes con AR y SC, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.037$) (Figura 11). Los pacientes con AR mostraron niveles más elevados de PRL que los SC (mediana 11.06 ng/mL vs. 9.99). Adicionalmente, se observó hiperprolactinemia (PRL >20 ng/mL) en 12% de los pacientes con AR y 7% en SC.

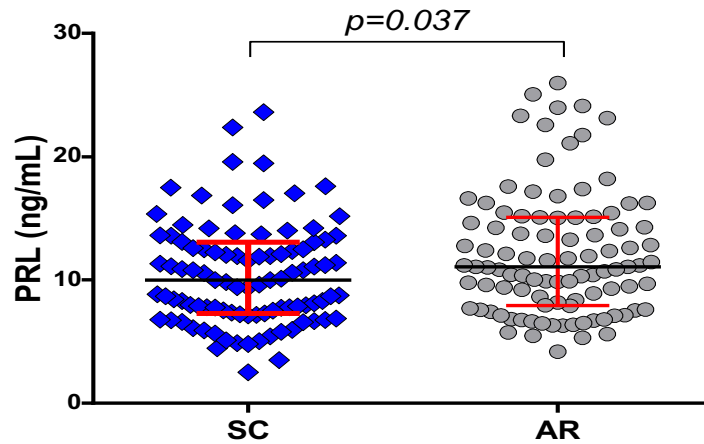


Figura 11 | Niveles séricos de PRL en pacientes con AR y SC
 Datos proporcionados en medianas y percentiles 5-95. Prueba de Mann-Whitney. AR: artritis reumatoide; SC: sujetos control.

Para evidenciar la participación de PRL en la evolución de la enfermedad, los pacientes fueron sub-agrupados de acuerdo al tiempo de evolución de la enfermedad: en AR temprana (< 2 años) y AR establecida (> 2 años), tomando como referencia la primera manifestación clínica de la enfermedad. Al comparar los niveles de PRL en ambos grupos, se observó que los pacientes con AR temprana tienen niveles más elevados ($p=0.01$) de esta hormona-citocina (Figura 12).

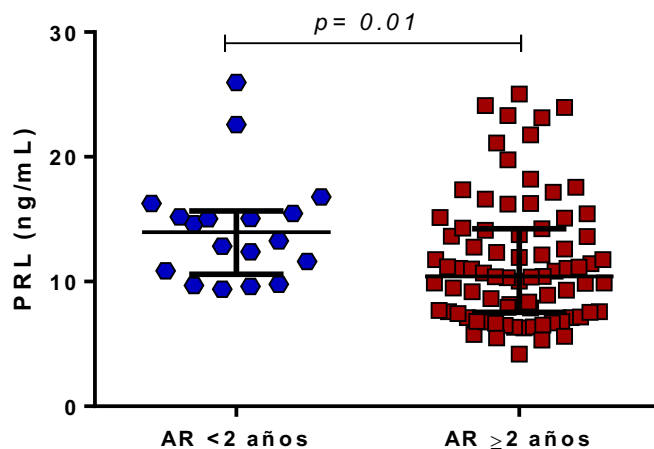


Figura 12 | Niveles séricos de PRL en pacientes con AR temprana y establecida. Datos proporcionados en medianas y percentiles 5-95. Prueba de Mann-Whitney.

Por otro lado, al comparar los niveles de PRL por edad se observó una correlación negativa moderada entre ambas variables tanto en pacientes con AR como en SC (Figura 13).

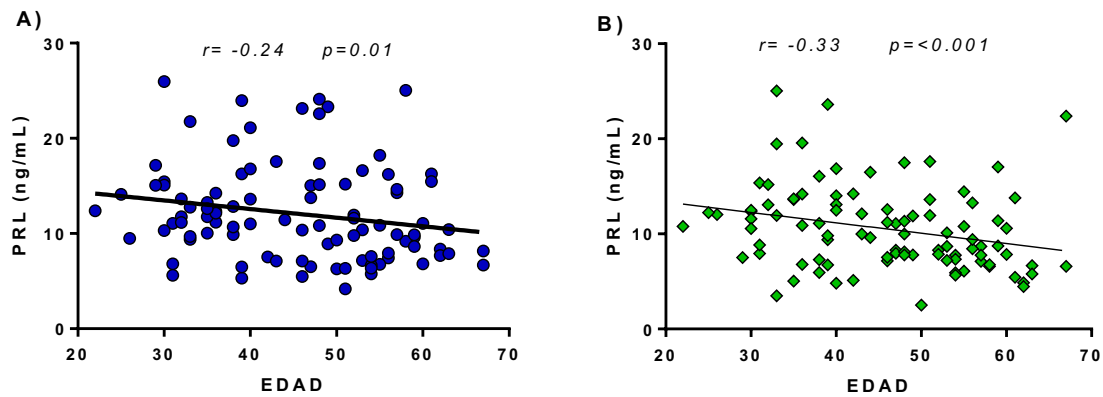


Figura 13 | Correlación de los niveles séricos de PRL con la edad

A) Se observa una correlación negativa entre los niveles séricos de PRL y la edad en pacientes con AR. B) Se observa una correlación negativa entre los niveles séricos de PRL y la edad en los SC. Prueba de correlación de Spearman.

7.6 Asociación del SNP -1149 G>T con niveles séricos de PRL, parámetros clínicos y actividad clínica en AR y SC

Se analizó el impacto del SNP -1149 G>T en el gen *PRL* sobre los niveles séricos de PRL, por lo que se estratificaron los niveles de PLR de acuerdo a los genotipos obtenidos en pacientes con AR y SC (Figura 14). En ambos grupos los portadores del genotipo GG presentaban mayores niveles de PRL, no obstante, esta diferencia no fue significativa ($p > 0.05$).

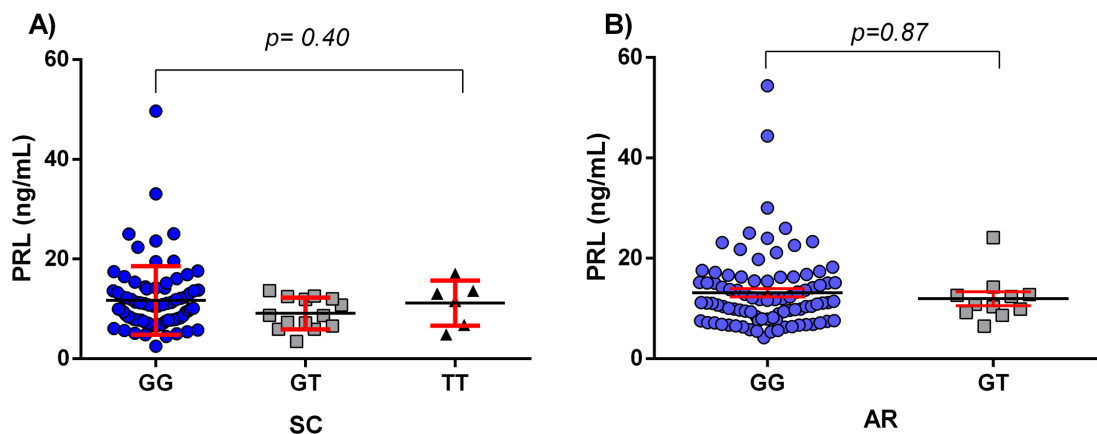


Figura 14 | Comparación de los niveles de PRL por genotipo en AR y SC

A) Se muestra la comparación en el grupo SC; prueba de Kruskal-Wallis. B) Se puede observar la comparación en los pacientes con AR; prueba U de Mann-Whitney.

Además, se realizó la comparación de los niveles de FR por genotipo en pacientes con AR y SC, y se observó que los portadores del genotipo GG presentaban una tendencia a mayores niveles de FR comparados con los genotipos GT y TT, pero estas diferencias no fueron significativas ($p>0.05$) (Figura 15).

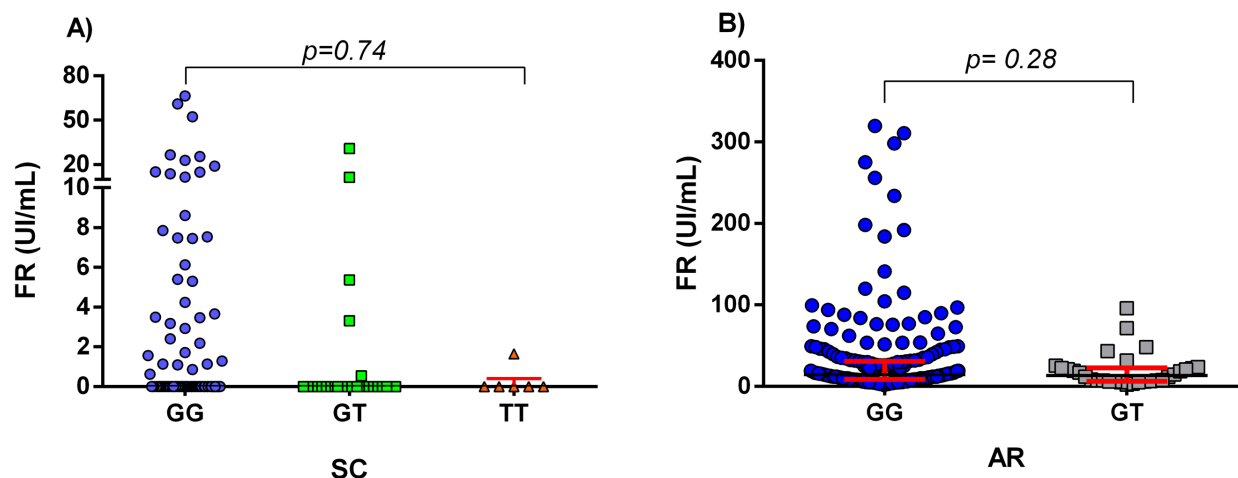


Figura 15 | Comparación de los niveles de FR por genotipo en AR y SC

A) Se muestra la comparación de FR por genotipo en el grupo SC; prueba de Kruskal-Wallis. B) Se puede observar la comparación de FR por genotipo en los pacientes con AR; prueba U de Mann-Whitney.

También se analizaron los niveles de proteína C reactiva por genotipo en los grupos de AR y SC se detectó una tendencia de niveles de pCr más elevados en los portadores del genotipo GG en comparación con los genotipos GT y TT en ambos grupos de estudio, sin resultados significativos ($p>0.05$) (Figura 16).

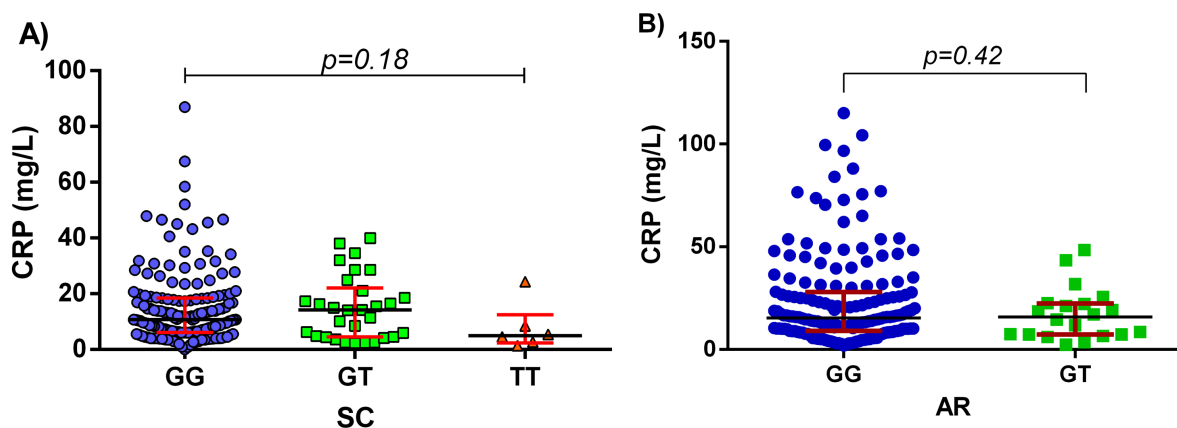


Figura 16 | Comparación de los niveles de pCr por genotipo en AR y SC

A) Se muestra la comparación de pCr por genotipo en el grupo de SC; prueba de Kruskal-Wallis. B) Se puede observar la comparación de pCr por genotipo en los pacientes con AR; prueba U de Mann-Whitney.

7.7 Asociación de los niveles séricos de PRL con actividad clínica y parámetros clínicos en AR

Se determinó la asociación de los niveles séricos de PRL en pacientes con AR en relación con el índice de actividad de la enfermedad DAS-28 y de discapacidad HAQ, así como la correlación de PRL con autoanticuerpos y reactantes de fase aguda. En la Figura 17 se muestra la comparación de los niveles séricos de PRL con base en la actividad de la enfermedad que presentaban los pacientes (valores de DAS-28). No se observaron diferencias significativas entre estos grupos.

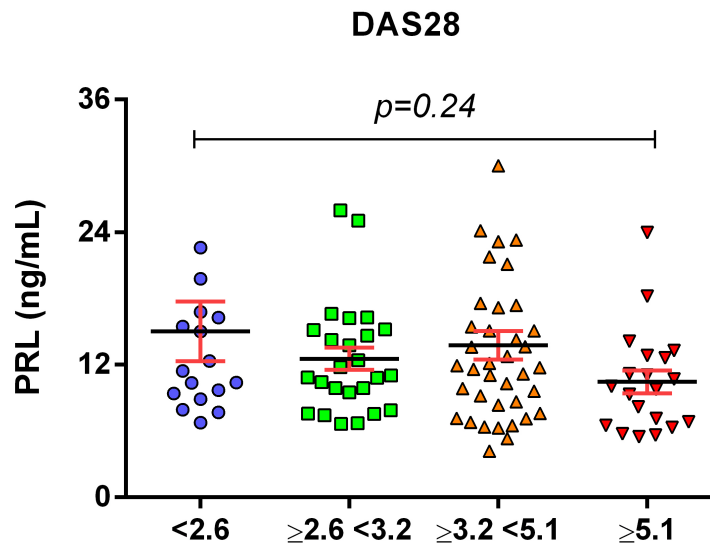


Figura 17 | Comparación de los niveles de PRL por DAS 28 en AR

Los valores del índice DAS28 menores a 2.6 denotan remisión en la actividad, de 2.6 a 3.2 corresponden a baja actividad, a partir de 3.2 hasta 5.1 es de actividad moderada y mayor a 5.1 significa actividad alta de la enfermedad. Prueba de Kruskal-Wallis.

En la Figura 18 se muestra la correlación de los niveles séricos de PRL con base en la discapacidad que presentaban los pacientes (valores del HAQ). Se observó una correlación negativa moderada ($r=-0.30$; $p=0.002$) entre los niveles solubles de PRL y los valores del HAQ.

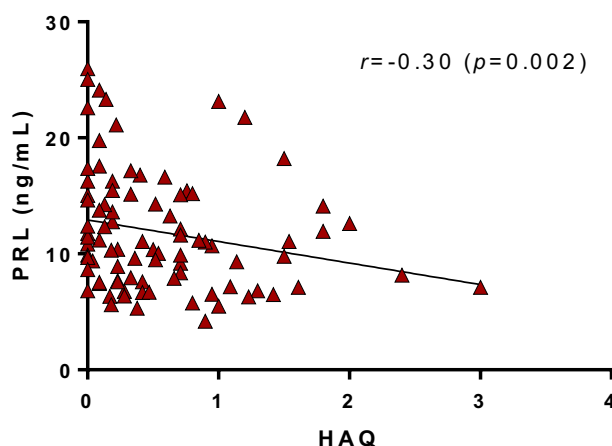


Figura 18 | Correlación de los niveles de PRL con el HAQ en AR

Se observa una correlación negativa entre los niveles séricos de PRL y los valores del HAQ en AR. Prueba de correlación de Spearman.

En la Figura 19 se observan la correlación entre los niveles séricos de PRL con los anticuerpos anti-CCP en pacientes con AR y la comparación de los niveles séricos de PRL entre pacientes positivos y negativos para anticuerpos anti-CCP. Sin embargo, aunque se observaron niveles de PRL más altos en los pacientes positivos para anti-CCP, los resultados no son estadísticamente significativos.

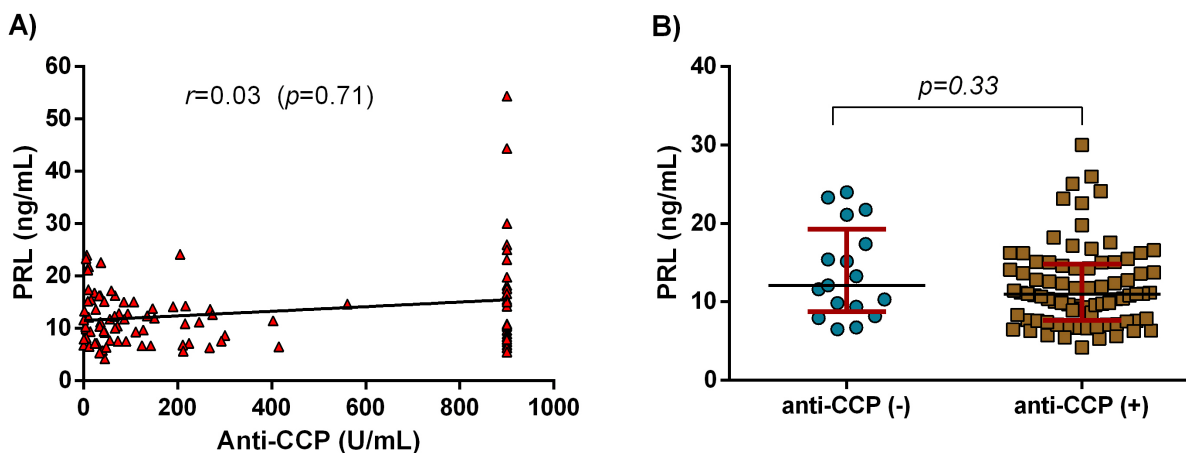


Figura 19 | Relación y comparación de los niveles de PRL con anti-CCP en AR

A) Se observa la tendencia de una correlación positiva entre los niveles séricos de PRL y los anti-CCP en AR. Prueba de correlación de Spearman. **B)** Comparación de los niveles séricos de PRL entre pacientes con AR negativos y positivos para anticuerpos anti-CCP. Prueba U de Mann-Whitney.

Por otro lado, se realizó el análisis estadístico para determinar si existía correlación entre los niveles séricos de PRL y los anti-MCV en pacientes con AR, sin embargo, no se observaron diferencias significativas (Figura 20).

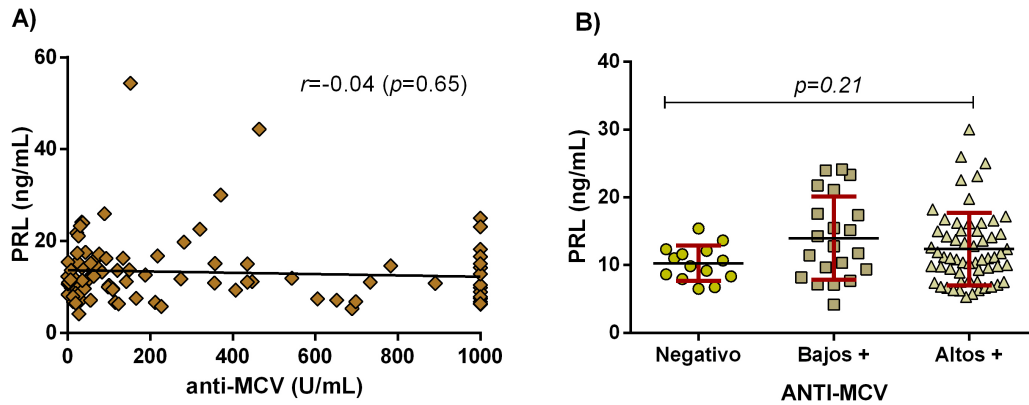


Figura 20 | Niveles de PRL y su asociación con anti-MCV en AR

A) Se observa una tendencia hacia una correlación negativa entre los niveles séricos de PRL y los anti-MCV en AR. Prueba de correlación de Spearman. **B)** Se observa la comparación de los niveles séricos de PRL entre pacientes negativos, bajos positivos y altos positivos para anti-MCV en AR. Prueba Kruskal-Wallis.

También, se observó una tendencia hacia una correlación positiva entre los niveles séricos de PRL y el FR en los pacientes con AR, sin encontrar resultados estadísticamente significativos. Se estratificaron los niveles de PRL con base en pacientes que presentaban FR negativo, bajo positivo y alto positivo, observando que los pacientes altos positivos para FR presentaban niveles de PRL más altos, pero estos resultados no alcanzaron significancia estadística (Figura 21).

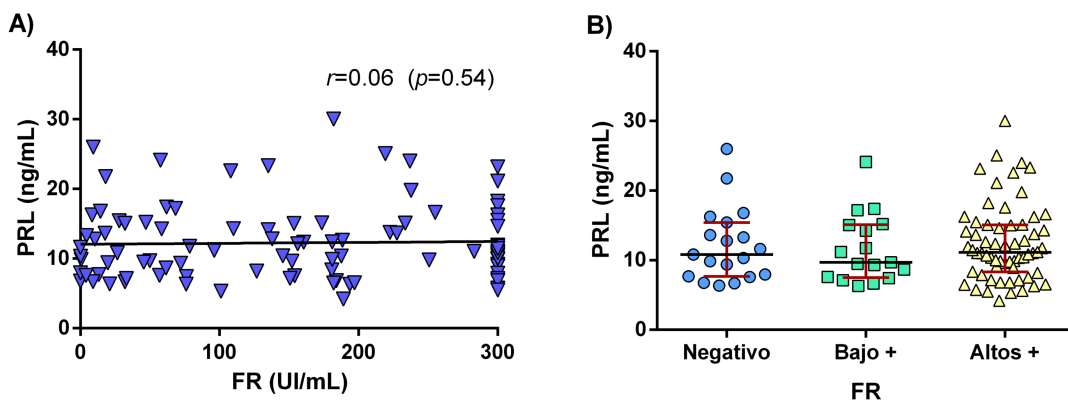


Figura 21 | Niveles séricos de PRL y su relación con FR en AR

A) Se observa una tendencia hacia una correlación positiva entre los niveles séricos de PRL y FR en AR. Prueba de correlación de Spearman. **B)** Comparación de los niveles séricos de PRL entre pacientes negativos, bajos positivos y altos positivos para FR en AR. Prueba Kruskal-Wallis.

Por otra parte, no se observó una correlación entre los niveles séricos de PRL y los valores de VSG de los pacientes con AR, sin embargo, los pacientes con VSG elevada presentaban valores de PRL más altos (datos no mostrados).

7.8 Expresión del mRNA del gen de *PRL* en AR y SC

La expresión del mRNA de *PRL* se evaluó a partir de leucocitos totales de sangre periférica en pacientes con AR y SC previamente genotipificados (Figura 22). Al comparar la expresión total de *PRL* en ambos grupos, el análisis por el método $2^{-\Delta\Delta Cq}$ mostró que la expresión de mRNA de *PRL* en pacientes AR era 2.5 veces mejor en comparación con SC; esta diferencia fue significativa cuando se evaluó mediante el método $2^{-\Delta Cq}$ ($p = 0.046$).

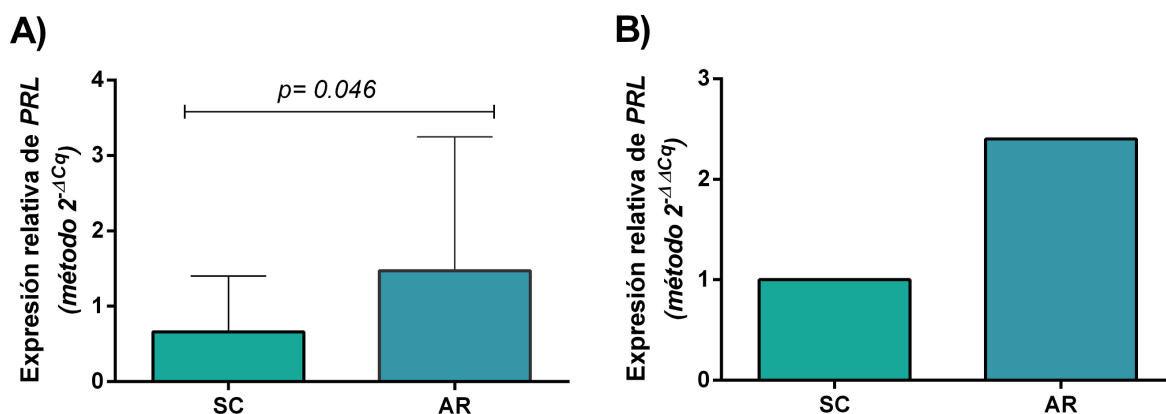


Figura 22 | Expresión relativa de PRL en ambos grupos de estudio.

^{Cq}. B) Análisis de la expresión de PRL por *-actina* fue utilizada como gen de referencia. Las comparaciones

Para evaluar el impacto funcional del polimorfismo -1149 G>T en la expresión del mRNA del gen *PRL*, se analizó la expresión de acuerdo a los genotipos en ambos grupos de estudio. En los pacientes con AR, sólo se observó 1 individuo con el genotipo TT, por lo cual, la comparación se hizo entre los genotipos GG y GT. La expresión de mRNA de *PRL* fue similar en los portadores de ambos genotipos ($p = 0.86$), como se muestra en la Figura 23.

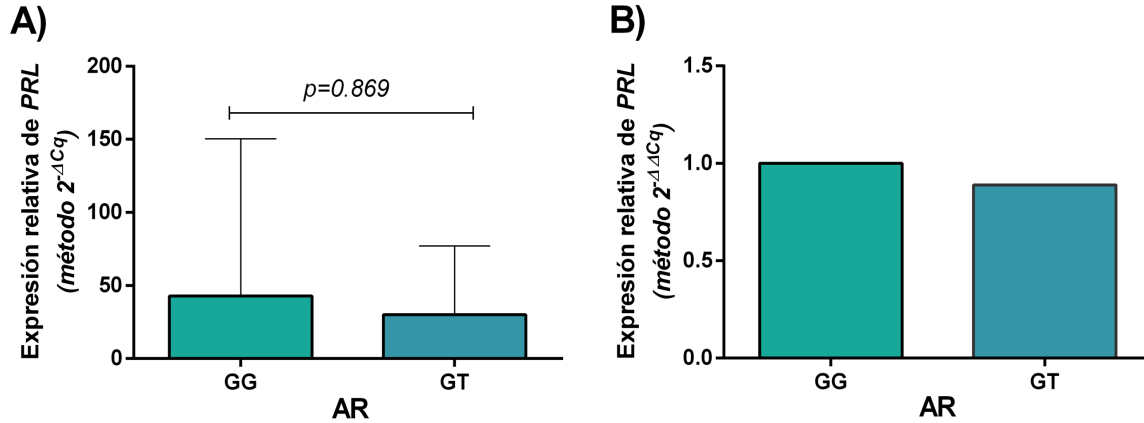


Figura 23 | Expresión relativa de PRL en pacientes con AR de acuerdo al genotipo del Cq . *-actina* fue utilizada como gen de referencia. Las comparaciones estadísticas entre los grupos se hicieron

Sin embargo, en los SC, se observó que los portadores del genotipo TT muestran menor expresión de *PRL* con respecto a los portadores del genotipo GG ($p > 0.05$). Mientras que los portadores del genotipo GT no mostraron diferencia al compararlos con los portadores del GG. Así mismo, se observó una diferencia significativa entre los tres genotipos ($p = 0.006$) (Figura 24).

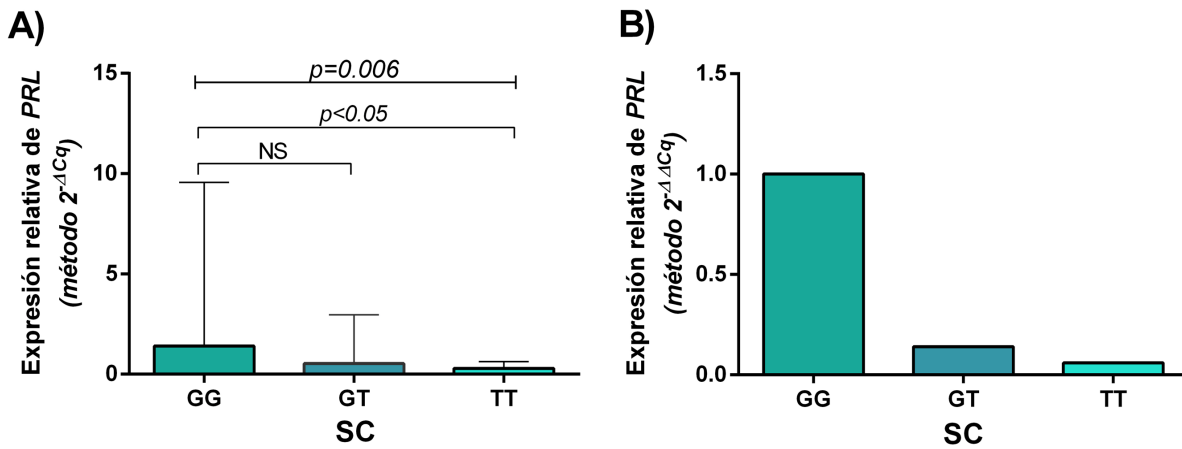


Figura 24 | Expresión relativa de PRL en SC de acuerdo al genotipo del polimorfismo Cq . B) Analisis de la *-actina* fue utilizada como gen de referencia.

Whitney.

8. DISCUSIÓN

La AR es una enfermedad autoinmune inflamatoria, crónica, sistémica, multifactorial y que afecta principalmente las articulaciones diartrodiales (Scott, 2010; McInnes, 2011). Además, es una de las enfermedades reumáticas más comunes, afectando alrededor del 0.5 al 1% de la población mundial (Aletaha, 2010), y en México al 1.6% (Pelaez-Ballestas, 2011), siendo esta enfermedad más frecuente en mujeres que en hombres con una relación 3:1 (Perricone et al., 2012). La AR constituye un problema de salud pública en el mundo debido a su prevalencia, las consecuencias discapacitantes, su impacto socioeconómico y el incremento en el uso de los servicios de salud entre quienes la padecen (Alvarez-Nemegyei, 2004; Mould-Quevedo, 2007).

La AR es una enfermedad multifactorial autoinmune de etiología desconocida, en donde la relación entre los diferentes factores ambientales, inmunológicos y genéticos determinan de manera contundente el grado de susceptibilidad, severidad y progresión de esta enfermedad (Liao, 2009).

El estudio de los factores genéticos y marcadores serológicos que influyen en la susceptibilidad a esta enfermedad, es una de las estrategias más utilizadas para poder comprender la fisiopatología de la AR. En el caso de los factores genéticos, el estudio de polimorfismos en genes candidatos, que tienen un papel en los mecanismos patogénicos o que se localizan en regiones del DNA asociadas a la enfermedad, permite determinar si un gen puede ser un marcador genético de susceptibilidad para esta enfermedad. De todos los polimorfismos que pueda portar un gen, las variantes funcionales son las más importantes, ya que estas se encuentran implicadas en la alteración de la estructura y/o función de las proteínas.

Sin embargo, los estudios de asociación de polimorfismos en genes implicados en la AR generalmente producen resultados contradictorios en diferentes poblaciones. Esto es debido a la diversidad étnica que existe entre las diferentes regiones del mundo, por lo que es importante replicar la posible asociación de los polimorfismos en diferentes poblaciones

para poder confirmar de manera concluyente las asociaciones genéticas (Kochi, 2010 Moreno-Estrada, 2014;).

A la fecha, los estudios genéticos han producido una lista en rápido crecimiento de *loci* de riesgo para AR; estos incluyen la región HLA, que contribuye a una alta susceptibilidad genética para la AR, así como otros genes no HLA tales como *PTPN22*, *STAT4*, *PADI4*, *MIF*, *CD40*, *PRL*, entre otros [Viatte and Barton, 2017].

El SNP -1149 G>T en el gen *PRL* ha sido estudiado en múltiples enfermedades autoinmunes como LEG, esclerosis múltiple, psoriasis y AR en población Europea y Mexicana (Stevens *et al.*, 2001; Fojtíková *et al.*, 2007; Montoya *et al.*, 2011; Reyes *et al.*, 2013). Sin embargo, este es el primer estudio que determina la asociación entre el SNP -1149 G>T en el gen *PRL* en pacientes del Sur de México.

En nuestro estudio se analizaron los datos de 300 pacientes con AR, todos originarios del Sur de México, observándose que existe una proporción más alta de pacientes del género femenino que masculino. Estos resultados coinciden con lo que se ha reportado previamente, que existe una mayor prevalencia de la enfermedad en mujeres con respecto a los hombres (3:1) (Silman, 2002). Por lo anterior, se sugiere que el componente hormonal puede tener un papel importante en la enfermedad. Se ha reportado que los estrógenos y la prolactina son inmunoestimuladores, que pueden favorecer la supervivencia de linfocitos B autorreactivos y la producción de anticuerpos, así como la secreción de MMPs (Straud, 2001; Shoenfeld, 2008). Por otro lado, los andrógenos y el cortisol son inmunosupresores, tienen propiedades antiinflamatorias, pueden inhibir citocinas (IL-1 β e IL-6), suprimir procesos de fagocitosis, impedir el estallido oxidativo y evitar la producción de ciclooxigenasa 2 inducible (Straud, 2001). En la AR, se ha documentado que los niveles de prolactina se encuentran incrementados, mientras que los niveles de cortisol y testosterona se encuentran disminuidos, lo que podría favorecer al establecimiento de la enfermedad (Jara, 2011).

En el presente estudio, se analizó el SNP -1149 G>T del gen *PRL* en pacientes con AR y SC del Sur de México. El cálculo del equilibrio génico poblacional se determinó en el grupo de SC, donde se observó que la población de estudio no estaba en equilibrio según el modelo de Hardy-Weinberg, lo cual indica que los diferentes genotipos no se han segregado de manera aleatoria en nuestra población. Sugerimos que esto es posiblemente debido a que en la población del Sur de México la tasa de migración es mayor a la de las regiones del Centro y Occidente de México. Mientras que la inmigración de individuos de otros países u otros estados de México hacia esta región geográfica es muy baja (CONAPO, 2015). Lo anterior, favorece a que predominen determinados genotipos en la población y puede explicar en gran parte la pérdida del equilibrio génico, además de que posiblemente exista reproducción endogámica en esta población del Sur de México.

Para confirmar esta hipótesis y estimar la tasa de endogamia de la población de estudio, se usaron las pruebas estadísticas F_{is} y F_{st} (Wright, 1949), las cuales indicaron que existe una gran divergencia genética en la población que es debida a procesos de endogamia. Este hallazgo se ven reforzados debido a que se observó un número de homocigotos mayor al esperado.

Sin embargo, las frecuencias genotípicas y alélicas reportadas en este estudio mostraron diferencias estadísticamente significativas al comparar entre pacientes con AR y SC. El genotipo TT se observó con mayor frecuencia en el grupo de controles que en grupo de pacientes, por lo cual se asoció con menor susceptibilidad a desarrollar AR que los portadores del genotipo GG o GT. De manera similar se observó que el alelo T fue más frecuente en controles que en pacientes. Para corroborar este resultado, se realizaron modelos genéticos de herencia y se observó a través del modelo de herencia dominante y recesiva, que los portadores del alelo T presentaban menor susceptibilidad a AR [Lewis, 2002; Iniesta, Guinó y Moreno, 2005]. Por lo cual, se corroboró que los portadores del alelo T tienen menos riesgo de presentar AR en comparación de los portadores del alelo G (OR 0.50, IC del 95%: 0.32-0.77; $p=0.001$). Estos resultados coinciden con lo reportado anteriormente por Lee et al. (2009), donde encontraron una asociación entre el alelo T y la susceptibilidad disminuida para AR (OR 0.90, IC del 95%: 0.84-0.96; $p=0.001$) en un

metanálisis conjunto de 4 poblaciones europeas (Lee et al., 2009). Así como lo reportado en la población del Occidente de México, donde observaron los portadores alelo T (modelo genético dominante) tienen menor riesgo a desarrollar AR (OR 0.64; IC del 95%: 0.45-0.92; $p=0.011$) (Reyes-Castillo et al., 2013). Sin embargo, nuestros resultados difieren de lo reportado por Fojtíková et al., donde encontraron que el genotipo GT fue más frecuente en el grupo de AR en comparación con el grupo de SC, lo que lo postula como un factor genético predisponente (OR 1.82, IC 95% 1.14 a 2.94, $p = 0.039$) (Fojtíková et al., 2007). Dado que la distribución del genotipo TT en nuestro estudio es más frecuente en SC, lo postulamos como genotipo protector en nuestra población más que como un genotipo de riesgo.

Estas diferencias en la distribución del polimorfismo de la PRL entre las poblaciones pueden deberse a la heterogeneidad genética. Un ejemplo bien conocido de este fenómeno en la AR es *PADI4*, cuya asociación con la enfermedad se ha demostrado claramente en poblaciones asiáticas y mexicanas, pero no en poblaciones europeas (Kochi et al., 2010; Guzman-Guzman et al., 2015; Baños-Hernández et al., 2017). Dado que las diferencias étnicas suelen ir de la mano con varias exposiciones ambientales, es útil estudiar las poblaciones distintivas con ciertas similitudes en sus antecedentes genéticos, para contribuir a una mejor comprensión de la compleja etiología y los factores genéticos implicados en la AR. Otro aspecto a considerar en las diferencias entre los estudios genéticos es el tamaño de la muestra; se ha postulado que la falta de reproducibilidad entre los estudios de asociación genética generalmente se debe a la reducción de la muestra y la falta de poder estadístico para detectar asociaciones bajas (Lewis, 2002).

Por otro lado, para evaluar la asociación del polimorfismo -1149 G>T en el gen *PRL* sobre los niveles de autoanticuerpos (FR, anti-CCP, anti-MCV) y reactantes de fase aguda (pCr, VSG), se realizó la comparación de estas variables de acuerdo al modelo genético dominante en los pacientes con AR, sin embargo, no se observaron diferencias significativas. En contraste con nuestros resultados, en población del occidente de México se reportó que los portadores del alelo G (GG) se asocia con títulos más elevados de anti-CCP en comparación de los portadores del alelo T (GT+TT) en pacientes con AR ($p=0.03$)

(Reyes-Castillo *et al.*, 2013). De manera similar, en pacientes con LEG, el alelo G se asocia con mayores títulos de anti-DNA (Montoya-Díaz *et al.*, 2011; Hernández-Bello *et al.*, 2017).

Existen diversos factores responsables de estas discrepancias, sin embargo, se ha demostrado que las células B poseen un mayor número de receptores de PRL que las células T (Dardenne *et al.*, 1994), la PRL se sinergiza con IL-2 y aumenta la síntesis de anticuerpos en las células B de una manera dependiente de la dosis (Lahat *et al.*, 1993) y los linfocitos T producen PRL autocrina cuando se activan por mitógeno y esto induce la expresión de moléculas coestimulantes como CD40L en células T y CD40 en células B (Chavez-Rueda *et al.*, 2007; Saha *et al.*, 2011) que son moléculas importantes durante la cooperación entre células T y células B. Dado que esta interacción celular es necesaria para lograr una producción eficiente de anticuerpos (respuesta humoral) (Mitchison, 2004), se sugiere que los linfocitos T colaboradores de los portadores del genotipo GG producen más PRL después de la activación y esto a su vez aumenta la producción de anticuerpos en las células B. Sin embargo, este mecanismo propuesto necesita más investigación (Reyes-Castillo *et al.*, 2013).

Otra posible explicación para la entre el alelo G y la presencia de autoanticuerpos en pacientes con LEG y AR (Stevens *et al.*, 2001; Montoya-Díaz *et al.*, 2011); podría ser que el alelo T se asocia con baja actividad promotora y disminución de la expresión de mRNA en comparación con el alelo G, porque puede producir un sitio de unión a GATA-3 en el promotor de prolactina, que puede estar actuando en modo inhibitorio. Sin embargo, se ha sugerido que factores adicionales pueden estar involucrados en la unión de GATA-3 en los dos alelos. Por lo tanto, es posible que esos factores estén involucrados en la unión al elemento -1149 y modifiquen la magnitud de la activación (Stevens *et al.*, 2001).

Al analizar la expresión de mRNA de *PRL*, se observaron diferencias significativas al comparar entre pacientes con AR y SC, observando mayor expresión en los pacientes. Cuando se analizó la expresión por genotipo, la expresión más alta se observó en los portadores de GG en comparación con los portadores de TT, en el grupo de SC. Estos

resultados coinciden con el estudio de Stevens et al. (2001), que muestra una mayor inducción de mRNA de PRL en leucocitos de sangre periférica con el genotipo GG en respuesta a la activación de células T por PHA que aquellos con el genotipo TT (Stevens et al., 2001). Mientras que en el estudio de Reyes-Castillo et al., no observaron diferencias en la expresión de mRNA de PRL entre pacientes con AR y SC, pero si observaron mayor expresión en los portadores el genotipo GG en comparación de genotipo TT, en ambos grupos de estudio (Reyes-Castillo et al., 2013).

Al analizar los niveles séricos de la proteína, se observó que los pacientes con AR tienen niveles más elevados de PRL que los SC (AR 11.06 ng/mL vs. SC 9.99 ng/mL, $p=0.037$). Estos resultados son similares a los de varios estudios que apoyan el papel de la PRL como un modulador importante en la respuesta inmunitaria y su participación en enfermedades autoinmunes como la AR (Stevens *et al.*, 2001; McInnes y Schett, 2011; Moszkorzová *et al.*, 2002; Orbach y Shoenfeld, 2007). Sin embargo, en la población del Occidente de México las concentraciones totales de PRL fueron similares en pacientes con AR y SC (Reyes-Castillo et al., 2013).

En nuestra población, también se evaluó la relación de los niveles séricos de PRL con el SNP -1149 G>T según un modelo genético dominante en ambos grupos de estudio. Al igual que en la población de Occidente de México, no se observaron diferencias significativas (Reyes-Castillo et al., 2013). Sugerimos que estos resultados se deben a que el polimorfismo PRL-1149 se encuentra en el promotor de la prolactina extrapituitaria, mientras que la mayoría de la PRL es sintetizada por la pituitaria (bajo el control de un promotor independiente).

El hecho de que las diferencias de los niveles séricos de PRL entre pacientes con AR y SC no alcancen significancia estadística en otras poblaciones, puede ser debido a que los pacientes con AR están sometidos a terapias farmacológicas específicas con fármacos que modifican la actividad de la enfermedad y por consecuencia, pudieran estar afectando los niveles séricos de PRL, ya que existen estudios que reportan una relación entre los

niveles séricos de PRL y actividad de la enfermedad (Moszkorzová *et al.*, 2002; Orbach *et al.*, 2007).

Por otra parte, encontramos una correlación negativa entre los niveles de PRL soluble y la edad en pacientes con AR ($r = -0.24$, $p=0.01$) y SC ($r = -0.33$, $p=0.01$), lo que indica que los niveles séricos de PRL tienden a disminuir con la edad, estos resultados concuerdan con lo reportado anteriormente (Vekemans y Robyn, 1975). Además, se observaron niveles séricos de PRL más elevados en pacientes con una duración de enfermedad de < 2 años (13.95 ng / ml) en comparación con pacientes con una duración de enfermedad de más de 2 años (10.42 ng / ml), con una diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.01$). Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado en población del Occidente de México por Reyes-Castillo y cols., en 2013. De manera similar, en pacientes con LEG se observó esta correlación negativa entre la edad y los niveles de PRL, además de niveles más elevados en pacientes con >1 año de evolución (Hernandez-Bello *et al.*, 2018). Esto podría explicarse debido a que los niveles de PRL se han relacionado en una forma directamente proporcional con la concentración de estrógenos circulantes, mismos que se ven modificados con la edad del paciente y pueden participar de manera significativa en el desarrollo de las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Da Silva, 1999; Cutolo *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2010).

Posteriormente, se determinó si existía asociación entre los niveles séricos de PRL y los niveles de autoanticuerpos (anti-CCP, anti-MCV y FR), sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados coinciden con un estudio realizado en 2007, donde no se encontró ninguna correlación entre los niveles séricos de PRL y títulos de autoanticuerpos como anti-CCP y FR (Orbach *et al.*, 2007). No obstante, existen estudios donde los niveles séricos de PRL se asocian directamente con los anticuerpos anti-DNA ($p \leq 0.02$) en pacientes con LEG [Jacobi, 2001; Rezaieyazdi y Hesamifard, 2006]. Estas inconsistencias pueden deberse a que, en el presente estudio, no se observaron niveles muy elevados (>20 ng/mL) de PRL en los pacientes con AR, por lo que tal vez son insuficientes para estimular la producción de anticuerpos de forma considerable y así observar una diferencia estadística.

Los anticuerpos anti-CCP y anti-MCV son considerados como marcadores biológicos para el diagnóstico de AR, los cuales son autoanticuerpos dirigidos contra proteínas citrulinadas en AR, como fibrinógeno, vimentina, colágeno tipo 2 y α -enolasa por acción de la enzima PADI4 que genera epítopes citrulinados en autoantígenos humanos. Estas proteínas citrulinadas, a su vez, modifican los mecanismos inmunológicos provocando la producción de citocinas que incrementan la inflamación en el tejido y erosión articular en el caso de AR [Pratt, Isaacs y Matthey, 2009; Wegner, 2010; McInnes y Schett, 2011; Taylor, 2011; Niu, 2014]

En este sentido, la PRL puede estar relacionada también con marcadores de inflamación, al estimular la producción de estos autoanticuerpos, por lo que se evaluó la correlación de los niveles de PRL con VSG y pCr en los pacientes con AR. Sin embargo, no se encontró correlación entre estas variables clínicas. Por otro lado, se han reportado asociaciones entre niveles séricos de PRL y reactantes de fase aguda (VSG y pCr) en otros estudios, lo que justifica que los reactantes de fase aguda como la VSG y la pCr se ven incrementados por la presencia de IL-6, citocina que se ha demostrado es estimulada por PRL y su receptor, en linfocitos T y también en sinoviocitos en enfermedad reumática [Jacobi, 2001; Fojtíková, 2010; Niu, 2014; Naderi, 2014; Costanza, 2015]. Finalmente, se compararon los niveles de PRL por genotipo en pacientes con AR y SC, observando tendencias a niveles más altos en los portadores del genotipo GG en comparación con los portadores del genotipo GT y TT, lo cual coincide con lo reportado por Stevens y cols. (2001). Estos resultados apoyan que el SNP -1149 G>T en el gen *PRL* afecta los niveles séricos de PRL; sin embargo, estos datos deben ser interpretados con precaución, debido a que la mayoría de los niveles séricos de PRL que se determinaron corresponden a la PRL hipofisaria y no a la PRL extra-hipofisaria que producen los linfocitos portadores del polimorfismo, por lo que esto pudiera ser una asociación estadística más que funcional.

De forma general, el presente estudio brinda resultados relevantes en el estudio del SNP -1149 G>T en el gen *PRL* debido a que es la primera ocasión en que se estudia en población del Sur de México y que su distribución ha resultado ser diferente a la reportada en población del Occidente y en población Europea, lo cual nos indica la gran variabilidad

genética de cada población y resalta la importancia de realizar el presente estudio en población del Sur de México.

Con base en lo anterior, es pertinente que se realicen nuevas investigaciones enfocados específicamente a los niveles séricos de PRL extra-hipofisarios, mediante estudios con cultivos celulares de linfocitos con y sin el polimorfismo analizado, para observar con mayor especificidad el impacto del SNP sobre los niveles de la PRL extra-hipofisaria y corroborar los resultados obtenidos.

9. CONCLUSIONES

En conclusión, se demostró que el alelo T del SNP -1149 G>T en el gen *PRL* es un marcador de menor susceptibilidad para AR en pacientes del Sur de México. Los hallazgos de una mayor expresión de mRNA y niveles séricos de PRL en pacientes con AR sugieren que esta hormona puede desempeñar un papel en el proceso de daño articular en la AR y puede favorecer la autoinmunidad en las primeras etapas de la AR, dado que los niveles séricos de PRL eran más altos en pacientes con <2 años de evolución de la enfermedad. La asociación del alelo -1149T de *PRL* como marcador protector para la AR podría explicarse mediante la baja regulación del promotor *PRL*, lo que se reflejó en la baja expresión de *PRL* observada en los portadores del alelo T (GT y TT).

Limitaciones y perspectivas del estudio

Limitaciones

- La población control no presenta una distribución normal de los alelos de este polimorfismo
- Un porcentaje importante de los pacientes con AR estaban bajo tratamientos inmunosupresores como metotrexato y prednisona, los cuales pueden haber afectado parámetros clínicos como el DAS-28 y el HAQ-DI español

Perspectivas

- Se sugiere replicar este estudio en otras poblaciones de México para confirmar esta asociación y establecer a este polimorfismo como posible marcador genético de protección para AR
- Medir PRL soluble y mRNA directamente en el sitio de la afección (líquido sinovial)
- Evaluar más parámetros que se pudieran ver afectados por la PRL soluble como los niveles de citocinas
- Es pertinente que se realicen nuevas investigaciones enfocados específicamente a los niveles séricos de PRL extra-hipofisarios para observar con mayor especificidad el impacto del SNP sobre los niveles de la PRL extra-hipofisaria

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA.** Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 2006; 36:182-188.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al.** 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria. An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Arthritis Rheum* 2010; 2(9): 2569-2581.
- Álvarez-Nemegyei J, Nuño-Gutiérrez BL, Alcocer-Sánchez JA.** Enfermedades reumáticas y discapacidad laboral en población adulta rural. *Rev Med IMSS* 2005; 43 (4): 287-292.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al.** The ARA 1987 revised criteria for the classification of the rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31(3):315-324.
- Avouac J, Gossec L, Dougados M.** Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:845–851.
- Baka Z, Buzás E, Nagy G.** Rheumatoid arthritis and smoking: putting the pieces together. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 238.
- Barrett JH, Brennan P, Fiddler M, Silman AJ.** Breast-feeding and postpartum relapse in women with rheumatoid and inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:1010–1015.
- Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW.** What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev* 2008; 29(1): 1–41.
- Besedovsky HO, del Rey A.** Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996; 17: 64-102.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, et al.** Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 1998; 19 (3): 225-268.
- Bowman SJ.** Hematological manifestations of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2002;31(5):251-9.
- Brandebourg T, Hugo E, Ben-Jonathan N.** Adipocyte prolactin: regulation of release and putative functions. *Diabetes Obes Metab* 2007; 9: 464–476.
- Brown PB, Nardella FA, Mannik M.** Human complement activation by self-associated IgG rheumatoid factors. *Arthritis Rheum* 1982; 25:1101–1107.
- Bruce B, Fries JF.** The Health Assessment Questionnaire (HAQ). *Clin Exp Rheumatol* 2005; 23 (Suppl. 39): S14-S18.
- Buch MH, Emery P.** The aetiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Hosp Pharmacist* 2002; 4: 5-10.
- Buckley AR.** Prolactin, a lymphocyte growth and survival factor. *Lupus* 2001; 10: 684-690.
- Cardon LR, Bell JI.** Association study designs for complex diseases. *Nat Rev Genet* 2001; 2:91-9.
- Carson DA, Chen PP, Fox RI, et al.** Rheumatoid factor and immune networks. *Annu Rev Immunol* 1987; 5:109–26.
- Carreno PC, Jimenez E, Sacedon R, et al.** Prolactin stimulates maturation and function of rat thymic dendritic cells. *J Neuroimmunol* 2004; 153: 83-90.

- Chavez-Rueda K, Hernández J, Zenteno E, et al.** Identification of prolactin as a novel immunomodulator on the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions on T and B human lymphocytes. *Clin Immunol.* 2005A;116(2):182-91.
- Chavez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Cervera-Castillo H, et al.** Prolactin effect on CD69 and CD154 expression by CD4+ cells from systemic lupus erythematosus patients. *Clin Exp Rheumatol* 2005B; 23: 769-777.
- Choi SJ, Rho YH, Ji JD, et al.** Genome scan meta-analysis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2006; 45(2): 166-170.
- Chomczynski P, Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem* 1987. 162:156-9.
- Choy EHS, Panayi GS.** Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001; 344(12) 907-916.
- Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I, et al.** Extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *J Clin Med* 2010; 5(4): 286-291
- Clair EW, Pisetsky DS, Hayness, BF.** Rheumatoid arthritis. Lippincott Williams & Wilkins. 2004; 11-26.
- Clevenger CV, Furth PA, Hankinson SE, et al.** The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocr Rev* 2003; 24: 1–27.
- Corbacho AM, Martínez de la Escalera G, Clapp C.** Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol* 2002; 173: 219–238.
- Cronstein BN.** Interleukin-6. A key mediator of systemic and local symptoms in rheumatoid arthritis. *Bull NYU hosp J Dis* 2007; 65(Suppl 1): S11-S15.
- Dardenne M, de Moraes MD, Kelly PA, et al.** Prolactin receptor expression in human hematopoietic tissues analyzed by flow cytometry. *Endocrinology* 1994;134: 2108–2114.
- De Bellis A, Bizzarro A, Pivonello R, et al.** Prolactin and Autoimmunity. *Pituitary* 2005; 8: 25–30.
- Dif F, Saunier E, Demeneix B, et al.** Cytokine inducible SH2-containing protein suppresses PRL signaling by binding the PRL receptor. *Endocrinology* 2001; 142 (12): 5286-5293.
- Ding W, Wu W.** Multiple human prolactin receptors and signaling. *Af Jour Biotech* 2010; 9 (7): 940-949.
- Dogusan Z, Hooghe R, Verdood P, et al.** Cytokine-like effects of prolactin in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes. *J Neuroimmunol* 2001; 120: 58-66.
- Donn RP, Farhan A, Stevans A, et al.** Neuroendocrine gene polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology* 2002; 41: 930-936.
- Doran MF, Crowson CS, O'Fallon WM, et al.** The effect of oral contraceptives and estrogen replacement therapy on the risk of rheumatoid arthritis: a population-based study. *J Rheumatol* 2004; 31: 207-213.
- Dougados M, Duchesne L, Amor B.** Bromocriptine and cyclosporine A combination therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998 31:1333–1341
- Duff GW.** Cytokines and acute phase proteins in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol Suppl.* 1994; 100:9-19.
- Espinosa M, Gottlieb BS.** Juvenile Idiopathic arthritis. *Pediatr Rev* 2012; 33(7): 303-313.

- Feldmann M.** Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nature Rev Immunol* 2002; 2: 362-371.
- Fernández-Cuenca F.** Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(6):355-360.
- Firestein GS.** Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003; 423: 356-361.
- Flores-Alfaro, Burguete-García AI, Salazar-Martínez E.** Diseños de investigación en epidemiología genética. *Rev Panam Salud Pública* 2012; 31(1):88-94.
- Fojtíková M, Cerna M, Cejkova P, et al.** Extrapituitary prolactin promoter polymorphism in Czech patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007; 000:1–2.
- Fojtíková M, Pavlina C, Radim B, et al.** Polymorphism of the extrapituitary prolactin promoter and systemic sclerosis. *Rheumatol Int* 2010A; (12):1691-1693.
- Fojtíková M, Studynková JT, Filková M, et al.** Elevated prolactin levels in patients with rheumatoid arthritis: association with disease activity and structural damage. *Clin Exp Rheumatol* 2010B; 28(6): 849-854.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, et al.** Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiol Rev* 2000; 80:1523-1631.
- Gabriel SE, Michaud K.** Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 229.
- Gellersen B, Kempf R, Telgmann R, et al.** Non-pituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Mol Endocrinol* 1994; 8 (3): 356-373.
- Gerlo S, Davis JR, Mager DL, et al.** Prolactin in man: A tale of two promoters, *Bioessays* 2006; 28 (10): 1051-1055.
- Gillam MP, Molitch ME.** Prolactin, Chapter 5. The pituitary. 3rd edition. Elsevier 2011: 119-166.
- Goldring SR.** Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2003; 42(Suppl. 2): ii11–ii16
- Gong YF, Wang GL, Diao HL, et al.** The effect of prolactin on the expression of matrix metalloproteinase-9 in the synovium of adjuvant arthritis rats [Chinese] *Chin Diar Applied Physiol* 2008; 24(1): 95-98.
- González DA, Brito-Díaz B, Rodríguez-Pérez MC, et al.** Sex hormones and autoimmunity. *Immunol Lett* 2010; 133: 6-13.
- Goronzy JJ, Weyand CM.** Developments in the scientific understanding of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 249-255.
- Gregersen PK.** Susceptibility genes for rheumatoid arthritis; a rapidly expanding harvest. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 2010; 68(3):179-182.
- Guzmán-Guzmán IP.** Asociación de polimorfismos en el gen PADI4 y del haplotipo funcional (GTG) con niveles de anticuerpos anti-CCP en pacientes mestizos mexicanos con artritis reumatoide. *Tesis de Grado; Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad de Guadalajara*, 2011.
- Hannaford PC, Kay CR, Hirsch S.** Oral contraceptives and rheumatoid arthritis: new data from the Royal College of General Practitioners' oral contraception study. *Ann Rheum Dis* 1990; 49: 744-746.

- Harney, S. M.** Genetic and genomic studies of PADI4 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44: 869–872.
- Horseman ND.** Prolactin receptor diversity in humans: novel isoforms suggest general principles. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 47-48.
- Hsu PC, Hour TC, Liao YF, et al.** Increasing ornithine decarboxylase activity is another way of prolactin preventing methotrexate-induced apoptosis: Crosstalk between ODC and BCL-2. *Apoptosis* 2006; 11: 389–399.
- Iniesta R, Guinó E, Moreno V.** Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit* 2005; 19 (4):333-341.
- Islander U, Jochems C, Lagerquist MK, et al.** Estrogens is rheumatoid arthritis; the immune system and bone. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 335(1): 14-29.
- Jacobi A, Rohde W, Volk H, et al.** Prolactin enhances the in vitro production of IgG in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus but not from healthy controls. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(3): 242–247.
- Jara LJ.** La interacción immuno-neuro-endocrina en enfermedades reumáticas autoinmunes: un nuevo desafío para el reumatólogo. *Reumatol Clin* 2011A; 7(2): 85-87.
- Jara LJ, Medina G, Saavedra MA, et al.** Prolactin and Autoimmunity. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2011B; 40: 50-59.
- Jara LJ, Vera-Lastra O, Miranda JM, et al.** Prolactin in human systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2001; 10:748–756.
- Keeler C, Dannies PS, Hodsdon ME.** The tertiary structure and backbone dynamics of human prolactin. *J Mol Biol* 2003; 328:1105-1121.
- Kishimoto M, Okimura Y, Yagita K, et al.** Novel function of the transactivation domain of a pituitary-specific transcription factor, Pit-1. *J Biol Chem* 2002; 277 (47): 45141-45148.
- Kochi, Y. Suzuki A, Yamada R, et al.** Ethnogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis—implications for pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* 2010; 6: 290–295.
- Koopman WJ, Boulware DW, Heudeberg GR.** Clinical Primer of rheumatology. Lippincott Williams & Wilkins. 2003; 97-115.
- Lahat N, Miller A, Shtiller R, et al.** Differential effects of prolactin upon activation and differentiation of human B lymphocytes. *J Neuroimmunol* 1993;47:35–40.
- Larrea F, Martinez-Castillo A, Cabrera V, et al.** A bioactive 60-kilodalton prolactin species is preferentially secreted in cultures of mitogen-stimulated and nonstimulated peripheral blood mononuclear cells from subjects with systemic lupus erythematosus. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3664–9
- Lee YC, Raychaudhuri S, Cui Y, et al.** The PRL –1149 G/T polymorphism and rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum* 2009; 60(5): 1250–1254.
- Liao KP, Alfredsson L, Karlson EW.** Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2009; 21(3): 279-283.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-DDCT} method. *Methods* 2001; 402–408.

- Lundsröm E, Källberg H, Alfredsson L, et al.** Gene-environment interaction between DRB1 shared epitope and smoking regarding risk of ACPA-positive rheumatoid arthritis - all alleles are important. *Arthritis Rheum* 2009; 60(6): 1597-1603.
- MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, et al.** Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1): 30-37.
- Mamehara A, Sugimoto T, Sugiyama D, et al.** Serum matrix metalloproteinase-3 as predictor of joint destruction in rheumatoid arthritis, treated with non-biological disease modifying anti-rheumatic drugs. *Kobe J Med Sci* 2010; 56 (3): 98-107.
- McInnes IB, Schett G.** Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Rev Immunol* 2007; (7): 429-442.
- McInnes IB, Schett G.** The Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011; 365: 2205-2219.
- Mellai M, Giordano M, D'Alfonso S, et al.** Prolactin and prolactin receptor gene polymorphisms in multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol* 2003; 64:274-84.
- Mendez I, Cariño C, Díaz L.** La prolactina en el sistema inmunológico: aspectos de síntesis y efectos biológicos. *Rev Inv Clin* 2005; 57(3): 447-456.
- Miller SA, Dykes DD, Pulesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988; 16: 1215-1219.
- Mohammed FF, Smookler DS, Khokha R.** Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003; 62(Suppl II): ii43-ii47
- Montoya-Díaz E, Cervera-Castillo H, Chávez-Sánchez L, et al.** Prolactin promoter polymorphism (-1149 G/T) is associated with anti-DNA antibodies in mexican patients with systemic lupus erythematosus. *Immunol Inv* 2011; 40: 614-626.
- Mota LM, Santos-Neto LL, Burlingame R, et al.** Laboratory characteristics of a cohort of patients with early rheumatoid arthritis. *Bras J Rheumatol* 2010; 50 (4): 375-388.
- Nagafuchi H, Suzuki N, Kaneko A, et al.** Prolactin locally produced by synovium infiltrating T lymphocytes induces excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1999; 26(9): 1890-1900.
- Nell VP, Machold KP, Stamm TA, et al.** Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:1731-1736.
- Nielen MM, van der Horst AR, van Schaardenburg D, et al.** Antibodies to citrullinated human fibrinogen (ACF) have diagnostic and prognostic value in early arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1199-204.
- Oliver JE, Silman AJ.** Why are women predisposed to autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Res Ther* 2009; 11: 252-261.
- Olsen NJ, Stein M.** New Drugs for Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2004; 350:2167-2179.
- Orbach H, Zandman-Goddard G, Boaz M, et al.** Prolactin and autoimmunity: hyperprolactinemia correlates with serositis and anemia in SLE patients. *Clin Rev Allergy Immunol* 2012; 42(2):189-98.
- Østensen M, Villiger PM.** The remission of rheumatoid arthritis during pregnancy. *Semin Immunopathol* 2007; 29: 185-191.

- Peeva E, Michael J, Cleary J, et al.** Prolactin modulates the naive B cell repertoire. *J Clin Invest* 2003; 111: 275-283.
- Perks CM, Keith AJ, Goodhew KL, et al.** Prolactin acts as a potent survival factor for human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 2004; 91 (2): 305-311.
- Ram S, Blumberg D, Newton P, et al.** Raised serum prolactin in rheumatoid arthritis: genuine or laboratory artefact? *Rheumatology* 2004; 43:1272–1274.
- Ramsey DH, Bern HA.** Stimulation by ovine prolactin of fluid transfer in everted sacs of rat small intestine. *J Endocrinol* 1972; 53: 453-459.
- Rangel-Villalobos H, Muñoz-Valle JF, González-Martín A, et al.** Genetic admixture, relatedness, and structure patterns among Mexican populations revealed by the Y-chromosome. *Am J Phys Anthropol* 2008;135(4):448-61.
- Rashid T, Ebringer A.** Rheumatoid arthritis is linked to Proteus--the evidence. *Clin Rheumatol* 2007; 26(7):1036-1043.
- Reem GH, Ray DW, Davis JR.** The human prolactin gene upstream promoter is regulated in lymphoid cells by activators of T-cells and by cAMP. *J Mol Endocrinol* 1999; 22: 285-92.
- Reyes-Castillo Z, Pereira-Suárez AL, Palafox-Sánchez CA, et al.** The extrapituitary prolactin promoter polymorphism is associated with rheumatoid arthritis and anti-CCP antibodies in Mexican population. *Gene* 2013;525:130-135.
- Rodríguez-Esparragón F, Rodríguez-Pérez JC, García-Bello MA.** Guía práctica a los estudios de asociación genética. Consideraciones sobre su utilidad clínica. *Nefrología* 2009; 29(6): 582-588.
- Rovensky J, Imrich R, Radikova Z, et al.** Peptide hormones and histamine in plasma and in sinovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Endocr Regul* 2005; 39(1): 1-6.
- Saha S, Gonzalez J, Rosenfeld G, et al.** Prolactin Alters the Mechanisms of B Cell Tolerance Induction. *Arthritis Rheum* 2009; 60(6): 1743–1752.
- Saha S, Tieng A, Pepeljugoski PK, et al.** Prolactin, systemic lupus erythematosus and autoreactive B cells: lessons learnt from murine models. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2011; 40: 8-15.
- Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW.** Rheumatoid arthritis (seminar). *Lancet* 2010; 376: 1094–1108.
- Sfrisio P, Ghirardello A.** Infections and autoimmunity: the multifaceted relationship. *J. Leukoc Biol* 2010 87: 000–000.
- Silman A, Kay A, Brennan P.** Timing of pregnancy in relation to the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992; 135: 152-155.
- Silman AJ, Pearson JE.** Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002; 4 (3): 265-272.
- Silva-Zolezzi I, Hidalgo-Miranda A, Estrada-Gil J. et al. (2008).** Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(21): 8611–8616.
- Sinha YN.** Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 1995; 16: 354-369.

- Smith CR, Norman MR.** Prolactin and growth hormone: molecular heterogeneity and measurement in serum. *Ann Clin Biochem* 1990; 27: 542–550.
- Smith HS, Smith AR, Seidner P.** Painful Rheumatoid Arthritis. *Pain Physician* 2011; 14: E427-E458.
- Somerville RP, Oblander SA, Suneel SA.** Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biol* 2003; 4: 216.
- Song YW, Kang EH.** Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *QJ Med* 2010; 103: 139-146.
- Stevens A, Hajeer A, John S, et al.** Identification of polymorphism in the prolactin gene region [abstract]. *Eur J Immunogenet* 1999; 26:77.
- Stevens A, Ray D, Alansari A, et al.** Characterization of a prolactin gene polymorphism and its associations with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2001; 44(10): 2358–2366.
- Stolfa J, Fojtikova M, Cejkova P, et al.** Polymorphism of the prolactin extrapituitary promoter in psoriatic arthritis. *Rheumatol Int* 2007; 27:1095–6.
- Szekanecz Z, Besenyeia T, Paraghb G, et al.** New insights in synovial angiogenesis. *Joint Bone Spine.* 2010; 77(1): 13–19.
- Teilum K, Hoch JC, Goffin V, et al.** Solution Structure of Human Prolactin. *J Mol Biol* 2005; 351: 810–823.
- Toussirot E, Roudier J.** Pathophysiological links between rheumatoid arthritis and the Epstein-Barr virus: an update. *Joint Bone Spine* 2007; 74(5):418-426.
- Turesson C, Jacobsson L, Matteson E.** Cardiovascular co-morbidity in rheumatic diseases. *Vasc Health Risk Manag* 2008; 4(3): 605-614.
- Turesson C, Jacobsson L, Sturfelt G, et al.** Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated peptides are associated with severe extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 59–64.
- Van der Heijde DM, van Riel PL, van Rijswijk MH, et al.** Influence of prognostic features on the final outcome in rheumatoid arthritis: a review of the literature. *Semin Arthritis Rheum* 1988; (4): 284-292.
- Van De Weerd C, Peers B, Belayew A, et al.** Far upstream sequences regulate the human prolactin promoter transcription. *Neuroendocrinology* 2000; 71: 124-137.
- Van Riel, Schumacher R.** How does one assess early rheumatoid arthritis in daily clinical practice? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001; 15(1): 67-76.
- Welniak LA, Tian ZG, Sun R, et al.** Effects of growth hormone and prolactin on hematopoiesis. *Leuk lymphoma* 2000; 38, 5-6: 435-445
- Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, et al.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 455–461.

11. ANEXOS

Anexo 11.1 Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial

Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos

Adoptada por:

- 18ª Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, junio 1964 y enmendada por la 29ª Asamblea Médica Mundial, Tokio, Japón, octubre 1975
- 35ª Asamblea Médica Mundial, Venecia, Italia, octubre 1983
- 41ª Asamblea Médica Mundial, Hong Kong, septiembre 1989
- 48ª Asamblea General Somerset West, Sudáfrica, octubre 1996
- 52ª Asamblea General, Edimburgo, Escocia, octubre 2000
- Nota de Clarificación del Párrafo 29, agregada por la Asamblea General de la AMM, Washington 2002
- Nota de Clarificación del Párrafo 30, agregada por la Asamblea General de la AMM, Tokio 2004
- 59ª Asamblea General, Seúl, Corea, octubre 2008

A. INTRODUCCIÓN

1. La Asociación Médica Mundial (AMM) ha promulgado la Declaración de Helsinki como una propuesta de principios éticos para investigación médica en seres humanos, incluida la investigación del material humano y de información identificables.

La Declaración debe ser considerada como un todo y un párrafo no debe ser aplicado sin considerar todos los otros párrafos pertinentes.

2. Aunque la Declaración está destinada principalmente a los médicos, la AMM insta a otros participantes en la investigación médica en seres humanos a adoptar estos principios.

3. El deber del médico es promover y velar por la salud de los pacientes, incluidos los que participan en investigación médica. Los conocimientos y la conciencia del médico han de subordinarse al cumplimiento de ese deber.

4. La Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial vincula al médico con la fórmula "velar solícitamente y ante todo por la salud de mi paciente", y el Código Internacional de Ética Médica afirma que: "El médico debe considerar lo mejor para el paciente cuando preste atención médica".

5. El progreso de la medicina se basa en la investigación que, en último término, debe incluir estudios en seres humanos. Las poblaciones que están sub representadas en la investigación médica deben tener un acceso apropiado a la participación en la investigación.

6. En investigación médica en seres humanos, el bienestar de la persona que participa en la investigación debe tener siempre primacía sobre todos los otros intereses.

7. El propósito principal de la investigación médica en seres humanos es comprender las causas, evolución y efectos de las enfermedades y mejorar las intervenciones preventivas, diagnósticas y terapéuticas (métodos, procedimientos y tratamientos). Incluso, las mejores

intervenciones actuales deben ser evaluadas continuamente a través de la investigación para que sean seguras, eficaces, efectivas, accesibles y de calidad.

8. En la práctica de la medicina y de la investigación médica, la mayoría de las intervenciones implican algunos riesgos y costos.

9. La investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales. Algunas poblaciones sometidas a la investigación son particularmente vulnerables y necesitan protección especial. Estas incluyen a los que no pueden otorgar o rechazar el consentimiento por sí mismos y a los que pueden ser vulnerables a coerción o influencia indebida.

10. Los médicos deben considerar las normas y estándares éticos, legales y jurídicos para la investigación en seres humanos en sus propios países, al igual que las normas y estándares internacionales vigentes. No se debe permitir que un requisito ético, legal o jurídico nacional o internacional disminuya o elimine cualquiera medida de protección para las personas que participan en la investigación establecida en esta Declaración.

B. PRINCIPIOS PARA TODA INVESTIGACIÓN MÉDICA

11. En la investigación médica, es deber del médico proteger la vida, la salud, la dignidad, la integridad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la confidencialidad de la información personal de las personas que participan en investigación.

12. La investigación médica en seres humanos debe conformarse con los principios científicos generalmente aceptados y debe apoyarse en un profundo conocimiento de la bibliografía científica, en otras fuentes de información pertinentes, así como en experimentos de laboratorio correctamente realizados y en animales, cuando sea oportuno. Se debe cuidar también del bienestar de los animales utilizados en los experimentos.

13. Al realizar una investigación médica, hay que prestar atención adecuada a los factores que puedan dañar el medio ambiente.

14. El proyecto y el método de todo estudio en seres humanos debe describirse claramente en un protocolo de investigación. Este debe hacer referencia siempre a las consideraciones éticas que fueran del caso y debe indicar cómo se han considerado los principios enunciados en esta Declaración. El protocolo debe incluir información sobre financiamiento, patrocinadores, afiliaciones institucionales, otros posibles conflictos de interés e incentivos para las personas del estudio y estipulaciones para tratar o compensar a las personas que han sufrido daños como consecuencia de su participación en la investigación. El protocolo debe describir los arreglos para el acceso después del ensayo a intervenciones identificadas como beneficiosas en el estudio o el acceso a otra atención o beneficios apropiadas.

15. El protocolo de la investigación debe enviarse, para consideración, comentario, consejo y aprobación, a un comité de ética de investigación antes de comenzar el estudio. Este comité debe ser independiente del investigador, del patrocinador o de cualquier otro tipo de influencia indebida. El comité debe considerar las leyes y reglamentos vigentes en el país donde se realiza la investigación, como también las normas internacionales vigentes,

pero no se debe permitir que éstas disminuyan o eliminen ninguna de las protecciones para las personas que participan en la investigación establecidas en esta Declaración. El comité tiene el derecho de controlar los ensayos en curso. El investigador tiene la obligación de proporcionar información del control al comité, en especial sobre todo incidente adverso grave. No se debe hacer ningún cambio en el protocolo sin la consideración y aprobación del comité.

16. La investigación médica en seres humanos debe ser llevada a cabo sólo por personas con la formación y calificaciones científicas apropiadas. La investigación en pacientes o voluntarios sanos necesita la supervisión de un médico u otro profesional de la salud competente y calificado apropiadamente. La responsabilidad de la protección de las personas que toman parte en la investigación debe recaer siempre en un médico u otro profesional de la salud y nunca en los participantes en la investigación, aunque hayan otorgado su consentimiento.

17. La investigación médica en una población o comunidad con desventajas o vulnerable sólo se justifica si la investigación responde a las necesidades y prioridades de salud de esta población o comunidad y si existen posibilidades razonables de que la población o comunidad, sobre la que la investigación se realiza, podrá beneficiarse de sus resultados.

18. Todo proyecto de investigación médica en seres humanos debe ser precedido de una cuidadosa comparación de los riesgos y los costos para las personas y las comunidades que participan en la investigación, en comparación con los beneficios previsibles para ellos y para otras personas o comunidades afectadas por la enfermedad que se investiga.

19. Todo ensayo clínico debe ser inscrito en una base de datos disponible al público antes de aceptar a la primera persona.

20. Los médicos no deben participar en estudios de investigación en seres humanos a menos de que estén seguros de que los riesgos inherentes han sido adecuadamente evaluados y de que es posible hacerles frente de manera satisfactoria. Deben suspender inmediatamente el experimento en marcha si observan que los riesgos que implican son más importantes que los beneficios esperados o si existen pruebas concluyentes de resultados positivos o beneficiosos.

21. La investigación médica en seres humanos sólo debe realizarse cuando la importancia de su objetivo es mayor que el riesgo inherente y los costos para la persona que participa en la investigación.

22. La participación de personas competentes en la investigación médica debe ser voluntaria. Aunque puede ser apropiado consultar a familiares o líderes de la comunidad, ninguna persona competente debe ser incluida en un estudio, a menos que ella acepte libremente.

23. Deben tomarse toda clase de precauciones para resguardar la intimidad de la persona que participa en la investigación y la confidencialidad de su información personal y para reducir al mínimo las consecuencias de la investigación sobre su integridad física, mental y social.

24. En la investigación médica en seres humanos competentes, cada individuo potencial debe recibir información adecuada acerca de los objetivos, métodos, fuentes de financiamiento, posibles conflictos de intereses, afiliaciones institucionales del

investigador, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento y todo otro aspecto pertinente de la investigación. La persona potencial debe ser informada del derecho de participar o no en la investigación y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Se debe prestar especial atención a las necesidades específicas de información de cada individuo potencial, como también a los métodos utilizados para entregar la información. Después de asegurarse de que el individuo ha comprendido la información, el médico u otra persona calificada apropiadamente debe pedir entonces, preferiblemente por escrito, el consentimiento informado y voluntario de la persona. Si el consentimiento no se puede otorgar por escrito, el proceso para lograrlo debe ser documentado y atestiguado formalmente.

25. Para la investigación médica en que se utilice material o datos humanos identificables, el médico debe pedir normalmente el consentimiento para la recolección, análisis, almacenamiento y reutilización. Podrá haber situaciones en las que será imposible o impracticable obtener el consentimiento para dicha investigación o podría ser una amenaza para su validez. En esta situación, la investigación sólo puede ser realizada después de ser considerada y aprobada por un comité de ética de investigación.

26. Al pedir el consentimiento informado para la participación en la investigación, el médico debe poner especial cuidado cuando el individuo potencial está vinculado con él por una relación de dependencia o si consiente bajo presión. En una situación así, el consentimiento informado debe ser pedido por una persona calificada adecuadamente y que nada tenga que ver con aquella relación.

27. Cuando el individuo potencial sea incapaz, el médico debe pedir el consentimiento informado del representante legal. Estas personas no deben ser incluidas en la investigación que no tenga posibilidades de beneficio para ellas, a menos que ésta tenga como objetivo promover la salud de la población representada por el individuo potencial y esta investigación no puede realizarse en personas competentes y la investigación implica sólo un riesgo y costo mínimos.

28. Si un individuo potencial que participa en la investigación considerado incompetente es capaz de dar su asentimiento a participar o no en la investigación, el médico debe pedirlo, además del consentimiento del representante legal. El desacuerdo del individuo potencial debe ser respetado.

29. La investigación en individuos que no son capaces física o mentalmente de otorgar consentimiento, por ejemplo los pacientes inconscientes, se puede realizar sólo si la condición física/mental que impide otorgar el consentimiento informado es una característica necesaria de la población investigada. En estas circunstancias, el médico debe pedir el consentimiento informado al representante legal. El consentimiento para mantenerse en la investigación debe obtenerse a la brevedad posible del individuo o de un representante legal.

30. Los autores, directores y editores todos tienen obligaciones éticas con respecto a la publicación de los resultados de su investigación. Los autores tienen el deber de tener a la disposición del público los resultados de su investigación en seres humanos y son responsables de la integridad y exactitud de sus informes. Deben aceptar las normas éticas de entrega de información. Se deben publicar tanto los resultados negativos e inconclusos

como los positivos o de lo contrario deben estar a la disposición del público..En la publicación se debe citar la fuente de financiamiento, afiliaciones institucionales y conflictos de intereses. Los informes sobre investigaciones que no se ciñan a los principios descritos en esta Declaración no deben ser aceptados para su publicación.

C. PRINCIPIOS APLICABLES CUANDO LA INVESTIGACIÓN MÉDICA SE COMBINA CON LA ATENCIÓN MÉDICA

31. El médico puede combinar la investigación médica con la atención médica, sólo en la medida en que tal investigación acredite un justificado valor potencial preventivo, diagnóstico o terapéutico y si el médico tiene buenas razones para creer que la participación en el estudio no afectará de manera adversa la salud de los pacientes que toman parte en la investigación.

32. Los posibles beneficios, riesgos, costos y eficacia de toda intervención nueva deben ser evaluados mediante su comparación con la mejor intervención probada existente.

33. Al final de la investigación, todos los pacientes que participan en el estudio tienen derecho a ser informados sobre sus resultados y compartir cualquier beneficio, por ejemplo, acceso a intervenciones identificadas como beneficiosas en el estudio o a otra atención apropiada o beneficios.

34. El médico debe informar cabalmente al paciente los aspectos de la atención que tienen relación con la investigación. La negativa del paciente a participar en una investigación o su decisión de retirarse nunca debe perturbar la relación médico-paciente.

35. Cuando en la atención de un enfermo las intervenciones probadas han resultado ineficaces o no existen, el médico, después de pedir consejo de experto, con el consentimiento informado del paciente o de un representante legal autorizado, puede permitirse usar intervenciones no comprobadas, si, a su juicio, ello da alguna esperanza de salvar la vida, restituir la salud o aliviar el sufrimiento. Siempre que sea posible, tales intervenciones deben ser investigadas a fin de evaluar su seguridad y eficacia. En todos los casos, esa información nueva debe ser registrada y, cuando sea oportuno, puesta a disposición del público.

Anexo 11.2 Carta de consentimiento informado

Hospital General Dr. Raymundo Abarca Alarcón
Secretaría de Salud Guerrero

Folio: _____

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio del presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado:

POLIMORFISMO EXTRAPITUITARIO -1149 DE *PRL* EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE DEL SUR DE MÉXICO: ASOCIACIÓN CON LA EXPRESIÓN DE SU mRNA Y VARIABLES CLÍNICAS

Se me ha explicado que mi participación consistirá en **responder un cuestionario y una toma de sangre periférica por punción venosa**. Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes y molestias derivados de mi participación en el estudio, como **la posible formación de un hematoma en la zona de punción**.

El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento, así como a responder mis preguntas y aclarar cualquier duda que tenga acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo o cualquier otro asunto relacionado con la investigación. Además de que me ha dado seguridades de que mi identidad no será divulgada en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos personales que proporcione serán manejados en forma confidencial.

NOTA: El número telefónico al que se podrá comunicarse para cualquier emergencia o dudas: (044) 7471242663

Lugar y fecha: _____

DR. JOSÉ EDUARDO NAVARRO ZARZA
CÉDULA PROFESIONAL: 3260845

Nombre y firma del paciente

Nombre, firma y matricula del investigador principal

Testigos:

Nombre y firma

Nombre y firma

Anexo 11.3 Datos demográficos

Fecha: _____

Folio: _____

DATOS DEL PACIENTE

Nombre: _____ Género: _____

Fecha de nacimiento: (Día ____ /Mes ____ /Año ____) Edad: ____ Edo.Civil: _____

Dirección (Calle y colonia): _____

Ciudad y Estado: _____ Tel.: _____

Atención del paciente: Seguro Popular: ____ Consulta Privada: ____ Otro: ____

Lugar de origen del paciente: Guerrero ____ Chiapas ____ Puebla ____ Oaxaca ____

Lugar de origen de sus padres: Madre ____ Padre ____

Lugar de origen de sus abuelos: Maternos (AM) ____ (AM) ____

Paternos (AP) ____ (AP) ____

Fecha de diagnóstico y evolución de la enfermedad: _____

ANTECEDENTES

Antecedentes Familiares:

Artritis reumatoide D.M. tipo 1 Atopia L.E.S. Asma

Otro: _____

Factores de riesgo

Escolaridad: Ninguna Primaria Secundaria Preparatoria Licenciatura No. de hermanos Uno Dos Tres Cuatro Mas No. de habitaciones en su casa durante la infancia Uno Dos Tres Cuatro o mas Lugar de origen Rural Urbano Lugar de residencia Rural Urbano Tabaquismo actual Si No Tabaquismo previo Si No Cocina con leña Si No

Tiempo de tabaquismo (años) y no. de cigarros al día: _____

Tiempo cocinando con leña y frecuencia : _____

Uso de anticonceptivos Si No

Antecedentes patológicos

Asma Sjogrën Hipertensión D.M. tipo 1 D. M. tipo 2 Dislipidemias Otras: _____

SIGNOS Y SINTOMAS				
	Si	No		Tiempo (min)
Rigidez matutina			Duración de la rigidez	
Fatiga			Duración de la fatiga	
Número de articulaciones afectadas				
Deformidad				
Inflamación crónica				

LABORATORIO					
	Si	No	Valor	Valores de biometría hemática	
VSG				Leucocitos	
Proteína C reactiva				Eritrocitos	
Factor reumatoide				Hemoglobina	
Erosión Articular				VCM	
Otros estudios:				HCM	
				Plaquetas	

TRATAMIENTO								
	Si	No	Dosis			Si	No	Dosis
AINES					Infliximab			
Metrotexate					Azatioprina			
H-Cloroquina					Ciclosporina			
Sulfazalacina					Sal de oro			
Corticosteroide					Omeprazol			
Leflunomida					Cirugía AR			
Etanercept					Otro: _____			

Peso (cm): _____ Talla (Kg): _____

Elaboró: _____





Anexo 11.4 Índice DAS-28

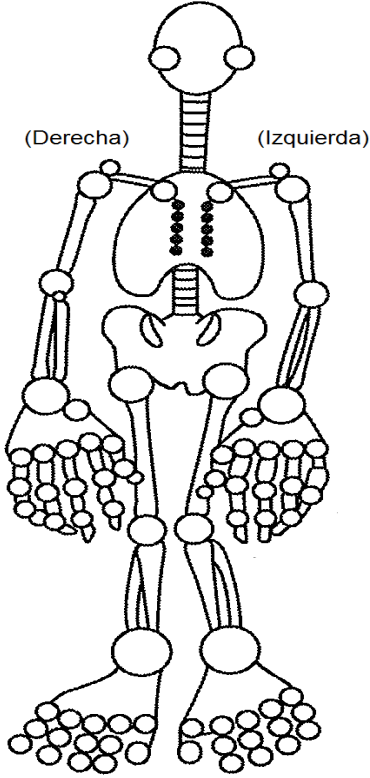
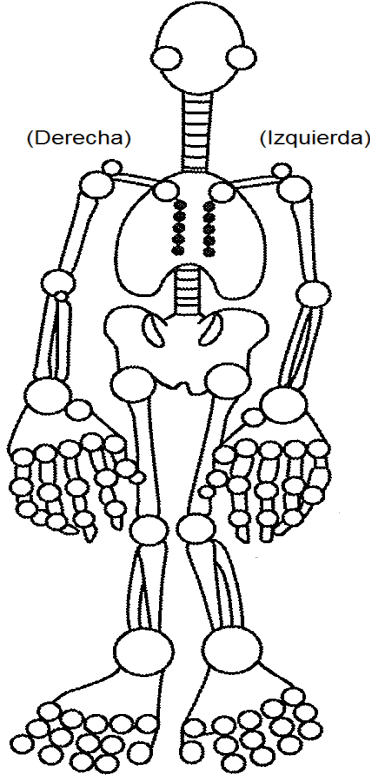
Para calcular el índice DAS se consideran 4 parámetros: la VSG; el número de articulaciones inflamadas; el número de articulaciones dolorosas (tomando en cuenta 28 articulaciones) y una escala análoga visual.

Para el cálculo se puede emplear un webcalculator (www.das-score.nl) o una hoja de Excel programada utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{DAS-28} = (0.56 \cdot \sqrt{\text{dolorosas28}}) + 0.28 \cdot \sqrt{\text{inflamadas28}} + 0.70 \cdot \text{Ln}(\text{VSG}) + 0.014 \cdot \text{escala análoga visual.}$$

- Alta actividad de la enfermedad > 5.1
- Baja actividad de la enfermedad < 3.2
- Remisión de la enfermedad < 2.6

NOMBRE DEL PACIENTE: _____ FECHA: _____																																	
ESCALA ANÁLOGA VISUAL DEL PACIENTE																																	
																																	
DOLOR: Por favor marque en esta escala el número que corresponda a su dolor:																																	
<table style="margin: auto;"> <tr> <td style="text-align: center;">0</td> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> <td style="text-align: center;">6</td> <td style="text-align: center;">7</td> <td style="text-align: center;">8</td> <td style="text-align: center;">9</td> <td style="text-align: center;">10</td> </tr> <tr> <td colspan="11" style="text-align: center;">  </td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">Sin dolor</td> <td colspan="4" style="text-align: center;">Con dolor</td> <td colspan="4" style="text-align: center;">Dolor insoportable</td> </tr> </table>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10												Sin dolor			Con dolor				Dolor insoportable			
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10																							
																																	
Sin dolor			Con dolor				Dolor insoportable																										
Nombre y firma del médico: _____																																	

ÍNDICE ARTICULAR DEL PACIENTE	
Nombre: _____ Registro: _____	
Rellene con pluma los círculos que representan las articulaciones afectadas:	
INFLAMACIÓN	DOLOR
	
No. Total, de articulaciones inflamadas: _____	No. Total de articulaciones con dolor: _____
Fecha: _____ Firma del médico: _____	

Anexo 11.5 Índice Spanish HAQ-DI

Health Assessment Questionnaire (Spanish HAQ-DI)					
Nombre del paciente: _____			Fecha: _____		
Por favor marque con una "X" la opción que mejor describa su situación actual:					
ACTIVIDAD	¿PUEDE USTED:	Sin dificultad	Con dificultad	Con ayuda de otro	No puedo
1. Vestirse y arreglarse	▪ ¿Sacar la ropa del closet (ropero) y cajones?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	▪ ¿Vestirse solo(a), inclusive abotonarse y usar el cierre?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	▪ ¿Lavarse el cabello?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Levantarse	▪ ¿Levantarse de una silla recta sin apoyarse de los brazos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Comer	▪ ¿Cortar la carne?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	▪ ¿Llevarse a la boca un vaso de líquido?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Caminar	▪ ¿Caminar en terreno plano?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. Higiene	▪ ¿Lavar y secar todo su cuerpo?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	▪ ¿Abrir y cerrar las llaves del agua?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	▪ ¿Sentarse y levantarse de la tasa de baño?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	▪ ¿Peinarse?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Alcance	▪ ¿Alcanzar y bajar una bolsa de 2 Kg? que esté por arriba de su cabeza?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Agarre	▪ ¿Abrir las puertas de un carro?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	▪ ¿Destapar un frasco de rosca no muy apretada?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	▪ ¿Escribir?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Actividad	▪ ¿Manejar un carro o coser en máquina de pedales?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	▪ ¿No puedo por causas ajenas a mi artritis?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	▪ ¿Salir de compras?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Sexo	▪ ¿Tener relaciones sexuales?	Sin ninguna dificultad	Algo molesto	Muy incómodo o limitado a ciertas posiciones	Me es imposible por la artritis
	▪ No tengo pareja: _____	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>