



Facultad de Estudios Superiores  
**IZTACALA**

**Universidad Nacional Autónoma De México**

---

---

**Facultad De Estudios Superiores Iztacala**

**Biología**

**Caracterización fenotípica y determinación de las características relacionadas con memoria inmune innata de las células T gamma delta de pacientes con espondiloartritis**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**HÉCTOR ADÁN ROMERO GARCÍA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**JOSÉ PABLO ROMERO LÓPEZ**



**FEBRERO, 2024**

**LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Apoyos económicos y aprobación del proyecto**

Este trabajo fue financiado por el programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica “PAPIIT” de la UNAM con clave IA206822.

Este trabajo fue aprobado por el comité de ética y bioseguridad del Hospital General de México con el número de registro DI/17/404-A/05/040.

## **Agradecimientos**

- A la Dra. María Lilia Domínguez López por brindarme un espacio en su laboratorio y apoyarme incondicionalmente.
- Al Dr. José Pablo Romero López por asesorarme, animarme y resolver siempre mis dudas.
- Al Dr. Julio Casasola por apoyarme con la obtención de muestras en el hospital.
- A la Mtra. Jessica Lakshmi por apoyarme en el procesamiento de muestras en el citómetro.
- A mi comité tutorial por aceptar participar en este proyecto, por sus valiosos comentarios y brindarme todas las facilidades posibles.
- A mis compañeres del laboratorio.

## **Dedicatoria**

Dedico esta tesis a mis padres y hermanos por ser un motor en mi vida, “se necesita valor para sentir en dolor”.

A mi abuelita por ser mi amiga, mi confidente y mi mano derecha.

He tenido muchas amistades y muy pocas han sido reconocidas, pero quiero dedicar este trabajo a mi amigo y cuñado que deveras estimo, Pablo.

A Nadxielii por acompañarme en este largo proceso, quererme y cuidarme “Nunca había despertado y voltear a ver a la persona que está a mi lado y en verdad sentir que podría amar a alguien”.

<b>Índice</b>	
<b>Índice de figuras</b> .....	4
<b>Índice de tablas</b> .....	5
<b>Abreviaturas</b> .....	6
<b>Introducción</b> .....	10
<b>Etiopatogenia de la SpA</b> .....	10
<b>Relación de la SpA con infecciones</b> .....	11
<b>Vías inflamatorias relacionadas con la SpA</b> .....	12
<b>Células T <math>\gamma\delta</math></b> .....	15
<b>Participación de las células T <math>\gamma\delta</math> la memoria inmune innata</b> .....	17
<b>Planteamiento del problema</b> .....	19
<b>Hipótesis</b> .....	19
<b>Objetivos</b> .....	20
General.....	20
Específicos .....	20
<b>Metodología</b> .....	20
Criterios De Inclusión:.....	20
Criterios De Exclusión: .....	20
Tamaño de la muestra.....	21
<b>Evaluación clínica</b> .....	21
<b>Procedimiento</b> .....	22
Determinación de la positividad para HLA-B27 .....	23
Estimulación celular .....	23
Estimulación celular y tinción de muestra .....	23
Tinción superficial.....	24
Tinción intracelular .....	24
<b>Análisis de datos</b> .....	24
<b>Aspectos de ética y bioseguridad</b> .....	24
<b>Resultados</b> .....	25
<b>Datos demográficos y clínicos</b> .....	25
<b>Estimulación celular y algoritmo de análisis</b> .....	27
<b>Análisis de muestras de sangre por citometría de flujo en pacientes y controles</b> .....	29
<b>Discusión</b> .....	46

<b>Conclusiones</b> .....	50
<b>Perspectivas</b> .....	50
<b>Referencias</b> .....	51
ANEXOS .....	61

## Índice de figuras

**Figura 1.** Procedimiento resumido de para posterior análisis por citometría.

**Figura 2.** Determinación de la concentración adecuada para la activación celular con LPS en sangre periférica de los pacientes reclutados.

**Figura 3.** Estrategia de análisis por citometría de flujo para la sangre de los pacientes y controles.

**Figura 4.** Porcentaje de células T  $\gamma\delta$  totales de pacientes comparados con controles.

**Figura 5.** Porcentaje de los subconjuntos de células T  $\gamma\delta$  totales (T  $\gamma\delta^{hi}$  y T  $\gamma\delta^{low}$ ) de pacientes comparados con controles.

**Figura 6.** Porcentaje de las células T  $\gamma\delta$  totales y sus subconjuntos T  $\gamma\delta^{hi}$  y T  $\gamma\delta^{low}$  positivas a la integrina  $\alpha 4\beta 7$  de pacientes comparados con controles.

**Figura 7.** Porcentaje de las células T  $\gamma\delta$  totales CD27 positivas y negativas, de pacientes comparados con controles.

**Figura 8.** Porcentaje de las células T  $\gamma\delta$  totales CD45RO positivas y, T  $\gamma\delta$  totales CD161 positivas de pacientes comparados con controles.

**Figura 10.** Porcentaje de las células T  $\gamma\delta$  totales CD45RO positivas y, T  $\gamma\delta$  totales CD161 positivas a la integrina  $\alpha 4\beta 7$ , de pacientes comparados con controles.

**Figura 11.** Intensidad media de fluorescencia de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  en las células T  $\gamma\delta$  totales CD27 positivas y CD27 negativas, en pacientes.

**Figura 12.** Intensidad media de fluorescencia de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  en las células T  $\gamma\delta$  totales CD45RO positivas y CD161 positivas, en pacientes.

**Figura 13.** Porcentaje de células T  $\gamma\delta$  totales productoras de IL-17 de pacientes comparados con controles.

**Figura 14.** Porcentaje de los subconjuntos de células T  $\gamma\delta$  totales (T  $\gamma\delta^{hi}$  y T  $\gamma\delta^{low}$ ) productoras de IL-17 de pacientes comparados con controles.

**Figura 15.** Porcentaje de células T  $\gamma\delta$  totales, y a su vez, positivas a la integrina  $\alpha 4\beta 7$  productoras de IL-17, de pacientes comparados con controles.

**Figura 16.** Porcentaje de las células T  $\gamma\delta$  totales CD27 positivas y CD27 negativas productoras de IL-17, en pacientes comparados con controles.

**Figura 17.** Porcentaje de las células T  $\gamma\delta$  totales CD45RO+ positivas y, T  $\gamma\delta$  totales CD161 positivas, productoras de IL-17 de pacientes comparados con controles.

**Figura 18.** Intensidad media de fluorescencia de CD27, CD45RO, CD161, en las células T  $\gamma\delta$  totales productoras de IL-17 de pacientes.

### **Índice de tablas**

Tabla 1. Panel de tinción por citometría de flujo.

Tabla 2. Panel de tinción para identificación de HLA-B27 positivo por citometría de flujo.

Tabla 3. Variables demográficas y clínicas de los pacientes reclutados.

Tabla 4. Información complementaria de las variables demográficas y clínicas de los pacientes reclutados.

## **Abreviaturas**

ADN: ácido desoxirribonucleico

axSpA: Espondiloartritis axial

BCG: Bacilo Clamette-Guérin

CMC: Citomegalovirus

EA: Espondilitis anquilosante

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal

GWAS: Estudio de asociaciones con el genoma completo

HGM: Hospital General de México

ILC3: Células linfoides innatas tipo 3

IMF: Intensidad media de fluorescencia

JIA: Artritis idiopática juvenil

LPS: lipopolisacárido

MHC: Molécula de Histocompatibilidad

NKR: Receptores asesinos naturales

NLR: receptores similares al tipo NOD

nr-axSpA Espondiloartritis axial no radiográfica

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PsA: Artritis psoriásica

PRR: Receptores de Reconocimiento de Patrones

pSpA: Espondiloartritis periférica

r-axSpA: Espondiloartritis axial radiográfica

ReA: Artritis reactiva

SpA: Espondiloartritis

TCR: Receptor de células T

TLR: Receptores tipo Toll

TNF: Factor de necrosis tumoral

## Resumen

Introducción: Las espondiloartritis (SpA), compone un grupo de enfermedades reumáticas inflamatorias crónicas que comparten características genéticas y clínicas. La prevalencia de estas enfermedades a nivel mundial es de 1.6%, y de 0.6% en México. La etiopatogénesis de las SpA es poco conocida, sin embargo, existen múltiples antecedentes que señalan la relación de las SpA con infecciones bacterianas. Se ha reportado que hasta un 60% de los pacientes con SpA presentan inflamación intestinal subclínica, lo cual podría ser uno de los factores fisiopatológicos más importantes de la enfermedad. En el intestino las interacciones entre el microbiota y el sistema inmunológico de los pacientes pueden conducir a la alteración de la barrera intestinal, activación y migración de anormal de células inmunes innatas como las células  $T\gamma\delta$  residentes del intestino, las cuales podrían depositarse en las articulaciones de los pacientes con SpA. Es probable que, considerando la relación con infecciones previas, estas células tengan un fenotipo de memoria que explique su respuesta inflamatoria.

Es por esto que, este estudio evaluó la frecuencia de células  $T\gamma\delta$  y su fenotipo proinflamatorio en muestras de sangre de pacientes con SpA.

Metodología: Se recolectaron muestras de 3 pacientes con SpA clasificados con los criterios ASAS, que fueron atendidos en el Hospital General de México (HGM) y que cumplieron con los criterios de inclusión. Mediante citometría espectral, se analizaron frecuencia y fenotipo de células  $T\gamma\delta$ ,  $T\gamma\delta^{hi}$ ,  $T\gamma\delta^{low}$ ,  $T\gamma\delta$  CD27+,  $T\gamma\delta$  CD27-,  $T\gamma\delta$  CD161+,  $T\gamma\delta$  CD45RO+,  $T\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7$ + en tres condiciones, tinción total a las 4 horas posterior a la recolección de la muestra, tinción total a las 24 horas incubada a 37°C, y una tinción total de la muestra estimulada con LPS a las 4 horas posterior a la recolección e incubada 24 horas a 37°C.

Resultados: Las células  $T\gamma\delta$  está aumentadas en pacientes con SpA en comparación con los controles (P=0.0173), se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de células  $T\gamma\delta$  CD27- en pacientes a diferencia de los controles (P=0.0063), al igual que la frecuencia de las células  $T\gamma\delta$  CD27-  $\alpha 4\beta 7$ + en pacientes

a diferencia de controles (P=0.0187). Por otra parte, se encontraron diferencias significativas en las células T $\gamma\delta$  IL17+ en pacientes (P=0.0205).

Conclusiones: Se encontró una frecuencia elevada de las células T $\gamma\delta$  en pacientes a diferencia de los controles, además, una frecuencia elevada de las células T $\gamma\delta$  negativas al marcador CD27, lo que indica un fenotipo proinflamatorio productor de IL17. Finalmente, se encontró que las células T $\gamma\delta$  CD27- son mayormente positivas a la integrina  $\alpha 4\beta 7$ .

## **Introducción**

La espondiloartritis (SpA) compone a un grupo de enfermedades reumáticas inflamatorias crónicas que comparten características genéticas, como una frecuencia elevada en la presencia del antígeno leucocitario HLA-B27, o clínicas como la sacroilitis observada en radiografías y resonancias magnéticas (Overview of the Clinical Manifestations and Classification of Spondyloarthritis - UpToDate, 2023). Algunas de las manifestaciones clínicas son: dolor lumbar, entesitis (inflamación de las entesis, las zonas donde los tendones o ligamentos se insertan en el hueso), tendinitis (inflamación del tendón), dactilitis (inflamación de los dedos) (de Winter *et al.*, 2016). Entre otras manifestaciones extraarticulares, se encuentran: uveítis, inflamación intestinal, psoriasis, y una asociación a trastornos infecciosos anteriores o en curso (Kiwalkar *et al.*, 2019).

La familia de las SpA se compone por la espondilitis anquilosante (EA) o espondiloartritis axial radiográfica (r-axSpA), espondiloartritis axial no radiográfica (nr-axSpA), la espondiloartritis periférica (pSpA), artritis psoriásica (PsA), artritis asociada a enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reactiva (ReA) y un subgrupo de artritis idiopática juvenil (JIA) (Dougados & Baeten, 2011; T Yu David and van Tubergen Astrid, 2023). Actualmente se clasifican en axial (axSpA) y periférica (pSpA) (López-Medina *et al.*, 2021).

La prevalencia reportada a nivel mundial para las SpA es del 1.6 %, mientras que la de la EA es del 0,24 % en Europa, 0,31% en América del Norte (Picchianti-Diamanti *et al.*, 2020), y del 0.6% en México (Peláez-Ballestas *et al.*, 2011; Peláez-Ballestas *et al.*, 2013). La prevalencia de los diferentes síntomas en la población mexicana es altamente variable, va del 1 al 25% para sacroilitis y del 3 al 30% para afección periférica (Peláez-Ballestas *et al.*, 2011).

## **Etiopatogenia de la SpA**

El mecanismo que rige a la patogénesis de las SpA no es completamente claro, sin embargo, existen avances en el análisis sobre el inicio de la enfermedad, asociando complejas interacciones ambientales, inmunológicas y genéticas (Mohammadi *et al.*, 2018). De este modo, se ha descrito que los factores genéticos son

determinantes en la susceptibilidad de las SpA, el alelo HLA-B27 ha sido considerado como uno de los más importantes (Schlosstein *et al.*, 1973), representando hasta un 90% de positividad en pacientes con EA. Además, se encuentran más de 100 subtipos de HLA-B27 los cuales se diferencian por unos pocos residuos de aminoácidos, siendo B\*2705 y B\*2702 los subtipos más comunes a nivel mundial (Bowness, 2015), asimismo, el subtipo B\*2705 se han encontrado particularmente en pacientes con EA (Bowness, 2015).

Por otra parte, con estudios de asociaciones con el genoma completo (GWAS) se han reportado más de 40 genes asociados con las SpA (Cortes *et al.*, 2013), como ERAP-1 altamente frecuente en pacientes con EA HLA-B27+ (Evans *et al.*, 2011).

Se han identificado otros genes implicados en respuestas inmunes de tipo 17 (IL-17A/IL-23) mantenidas por IL-23. En este sentido, se ha demostrado la presencia de niveles elevados de IL-23 e IL-17 en pacientes con EA (Chen *et al.*, 2012). Otros polimorfismos importantes asociados han sido *eomes*, *runx3*, *tbx21* y *card 9* (Cortes *et al.*, 2013).

### **Relación de la SpA con infecciones**

La relación de infecciones bacterianas en la inducción y progresión de múltiples trastornos inflamatorios incluidas las SpA no es clara. Se ha reportado la prevalencia de signos y síntomas de infecciones directamente relacionada con la actividad de la enfermedad en pacientes que desarrollaron SpA (Martínez *et al.*, 2004). Algunos estudios reportan la relación entre infecciones bacterianas y su asociación con las SpA (AC *et al.*, 1978; Haller-Schober & El-Shabrawi, 2002), demostrando la existencia de ADN bacteriano en análisis de líquido sinovial, encontrando niveles altos para anticuerpos séricos contra algunas bacterias identificadas como *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Yersinia* y *Klebsiella* (Pacheco-Tena *et al.*, 2001). Además, se identificó que más del 90% de pacientes con EA presentaban anticuerpos IgG en suero y líquido sinovial para *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Yersinia* y *Klebsiella* (Domínguez-López *et al.*, 2002; Pacheco-Tena *et al.*, 2001).

En este sentido, la fisiopatología de la ReA demuestra un acercamiento de las SpA con el microbioma pues está relacionada con infecciones gastrointestinales provocadas por *Salmonella*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Yersinia* y *Klebsiella*, o infecciones por *Chlamydia tracomatis*; se ha observado que aproximadamente el 20% de pacientes con ReA desarrollan EA en un plazo de 10 a 20 años (Granfors et al., 1990; Keat et al., 1978). Así mismo, en análisis de biopsias de articulaciones de pacientes con ReA se han detectado productos bacterianos de infecciones previas (Merilahti-Palo et al., 1991).

Recientemente se han realizado cuantificaciones directas del microbiota intestinal de pacientes con SpA y controles sanos a través de heces o biopsias intestinales permitiendo una caracterización de la asociación con bacterias, demostrando así la relación de las SpA con el microbioma (Breban et al., 2019).

### **Vías inflamatorias relacionadas con la SpA**

Dentro del estudio de las SpA, se han identificado en los pacientes sitios de inflamación específicos como en el intestino la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), en la piel la psoriasis (PsA) y en articulaciones la EA (Rudwaleit, Heijde, et al., 2009). En estos sitios de inflamación localizados, se han reportado un grupo característico de células TCD4+ productoras de IL-17A, IL-22 y factor de necrosis tumoral (TNF) denominadas Th17 las cuales contribuyen al desarrollo de enfermedades inflamatorias, incluyendo las SpA (Tesmer et al., 2008).

De esta manera, en investigaciones más centradas en las SpA se ha sugerido una asociación fisiopatológica de las Th17 al producir IL-17A e IL-22 en EII, PsA y EA (Cho, 2008).

Además de las células Th17 implicadas en la respuesta inflamatoria en las SpA, se conocen otros grupos de células innatas productoras de IL-17 e IL-22 conocidas como células linfoides innatas tipo 3 (ILC3) (Gaston & Jadon, 2017) y T $\gamma$  $\delta$  (Kenna et al., 2012; Santori et al., 2015; Wiarda & Loving, 2022). Estos subconjuntos de células son propios de las mucosas intestinales, y se han reconocido en mayor cantidad en pacientes con EA. La forma más severa de las SpA (Ciccia et al., 2015). Sin embargo, se han observado a estas poblaciones celulares en lugares distintos

al intestino como en la medula ósea y el líquido sinovial de pacientes con SpA, en estos sitios expresan marcadores de superficie particulares de intestino, por lo que se ha sugerido migración celular (Longman *et al.*, 2014) desde este sitio.

En función de las investigaciones en pacientes con SpA, se ha planteado un vínculo entre la presencia de la inflamación articular e inflamación de mucosas (intestino y piel), y con ello la propuesta sobre el eje intestino- piel- articulación (Bernal-Alferes *et al.*, 2021; Brakenhoff *et al.*, 2010). Dentro del eje intestino-articulación, se encuentra el sitio de entesis (inserción entre ligamento y tendones en el hueso), esta zona es un distintivo clínico con mayor afección e inflamación en pacientes con EA (Sherlock *et al.*, 2012).

El conocimiento sobre las poblaciones celulares residentes de las zonas de entesis aún no se ha identificado claramente; Sherlock en 2012, realizó un análisis de linfocitos T residentes de la entesis en un modelo murino de SpA, describió una población CD3+ CD4- CD8- ROR $\gamma$ t+IL-23+ secretoras de altas cantidades de IL-17 e IL-22, sugiriendo la amplia participación de una población de linfocitos T positivos al factor de transcripción ROR $\gamma$ t en la SpA (Sherlock *et al.*, 2012). En este sentido, Reinhardt y colaboradores en 2016, observaron una población celular que se ajustaba al fenotipo determinado por Sherlock en 2012, siendo células productoras de IL-17 en un modelo murino de SpA, demostraron que células T  $\gamma\delta$  dependientes de IL-23 son importantes secretoras de IL-17 en las entesis durante la SpA (Reinhardt *et al.*, 2016), estos estudios nos proporcionan un importante avance en el conocimiento de los grupos celulares responsables de la fisiopatología de la SpA donde el origen de la misma aún no es conocido claramente.

### **Relación de la inflamación intestinal SpA**

El vínculo entre la SpA y la inflamación intestinal se ha determinado a través de estudios donde se ha reportado que alrededor del 60% de los pacientes con SpA presentan inflamación intestinal subclínica y solo el 10% desarrolla algún tipo de EII (Picchianti-Diamanti *et al.*, 2020), incluyendo síntomas como la pérdida de peso, diarrea, dolor abdominal y fiebre, manifestándose en un pico de incidencia entre los 20 y 40 y entre los 50 y 60 años (C Abraham, 2009). Asimismo, se ha demostrado

un aumento de la permeabilidad intestinal en pacientes con SpA, permitiendo el paso a múltiples bacterias y péptidos microbianos que pueden desencadenar una respuesta inmunológica (Martínez-González *et al.*, 1994). Dentro del estudio de la alteración del microbioma en pacientes con SpA en comparación con controles, se ha encontrado una amplia diversidad y composición, lo que sugiere que no se trata de un conjunto en particular de microbios, si no una perturbación al microambiente relacionado con la inflamación (Gill & Rosenbaum, 2021; van de Sande & Elewaut, 2023).

Por otra parte, la prevalencia de afectación articular en pacientes con EII ha sido desde un 16% hasta un 33% (Brakenhoff *et al.*, 2010). En relación con estas manifestaciones clínicas presentes en los pacientes con SpA, se han buscado moléculas marcadoras donde se identifique el eje intestino-articulación (Ciccía *et al.*, 2015), como se ha observado en poblaciones de linfocitos  $T\gamma\delta$  que expresan integrinas clave precedentes a la inflamación intestinal (Do *et al.*, 2017).

Las integrinas, son de gran importancia en la homeostasis intestinal y en el reclutamiento de células inmunes en condiciones patológicas (Kempster & Kaser, 2014). Comprenden una familia de 24 receptores hetero dinámicos, caracterizados por una subunidad  $\alpha$  y otra  $\beta$ . Dentro de las integrinas más relevantes de comportamiento adhesivo al endotelio son miembro de la familia  $\beta 2$ , así como las integrinas  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 7$  (Carman & Springer, 2003). La integrina  $\alpha 4\beta 7$  característica del epitelio intestinal, cumple una de las funciones específicas para el reclutamiento de células T a la mucosa intestinal interaccionando con su ligando MAdCAM-1 (Kempster & Kaser, 2014). Se ha observado la expresión de cantidades elevadas de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  en linfocitos T aislados de tejido sinovial de pacientes con SpA (Jacques and Elewaut, 2008), lo que permite posicionarlo como un marcador de expresión importante en la transmigración celular en pacientes con SpA, al ser reconocida en el tráfico celular en el eje intestino-articulación (Ciccía *et al.*, 2015; Del Vescovo *et al.*, 2023; Qaiyum *et al.*, 2019).

## **Células T $\gamma\delta$**

Son un subconjunto de linfocitos T que se distinguen por receptor con cadenas gamma ( $\gamma$ ) y delta ( $\delta$ ), a diferencia de los linfocitos comunes T CD4 y T CD8 portadores de receptores con cadenas alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ ) (Vantourout & Hayday, 2013). Pertenecientes a la primera línea de defensa contra patógenos debido su rápida respuesta a señales de su TCR independiente del MHC y a señales de reconocimiento de patrones como TLRs (Vantourout & Hayday, 2013; Wesch *et al.*, 2011).

Comprenden tan solo entre el 1% y el 3.5% del total de los linfocitos T circulantes en los seres humanos, cabe destacar que las células T  $\gamma\delta$  representan alrededor del 60 % en tejidos deciduales, el 58% en mucosa intestinal y el 15 % de células T en piel (Karunathilaka *et al.*, 2022). La clasificación que se tiene en las células  $\gamma\delta$  son basadas en su cadena  $\delta$ . Las V $\delta$ 1 son predominantes en epitelios y mucosas, las V $\delta$ 2 son las más abundantes en circulación con aproximadamente del 50 al 90% de las células T $\gamma\delta$  en la circulación (Karunathilaka *et al.*, 2022), y por ultimo las V $\delta$ 3 siendo las más escasas y presentes en personas con infecciones o cáncer (Wu *et al.*, 2014). La gran mayoría de las células T $\gamma\delta$  circulantes en humanos expresan un heterodímero de TCR compuesto por cadenas V $\gamma$ 9 y V $\delta$ 2 que reconocen directamente ligandos no peptídicos sin presentación mediante moléculas de histocompatibilidad (MHC) (Dieli *et al.*, 2003a).

Son poseedoras de importantes características adaptativas e innatas, siendo una interfaz entre estos dos sistemas (Comeau *et al.*, 2020). En estudios recientes, se ha observado que las células T $\gamma\delta$  pueden estar implicadas en la inmunidad adaptativa, a través de una combinación entre receptores tipo Toll (TLR) y receptores asesinos naturales (NKR) que les permite el reconocimiento de antígenos bacterianos, virales y parasitarios, y en consecuencia expresar una respuesta mediadora a estos ataques (Kazen & Adams, 2011).

Por otra parte, se ha descrito que las células T $\gamma\delta$  tienen la capacidad de secretar citocinas como la IL-17A sin requerir a la IL-23 para su secreción inicial, pero si para mantener su producción (Ness-Schwickerath *et al.*, 2010), lo que permite una

rápida activación y reclutamiento de otro tipo de células como Th1, Th2, células NK, células B, macrófagos, eosinófilos y basófilos, lo que en conjunto es crucial para la eliminación de patógenos (Do et al., 2017; Giacomelli et al., 1994).

Se ha demostrado que las células T $\gamma\delta$  productoras de IL-17 se encuentran en niveles elevados tanto en circulación como en tejidos intestinales cuando se exponen a entornos inflamatorios, como se ha visto en la EII (Do et al., 2017; Giacomelli et al., 1994). Dentro de las enfermedades inflamatorias donde las células T  $\gamma\delta$  son importantes mediadoras se encuentran la PsA y artritis inflamatoria (Bernal-Alferes et al., 2023). En las investigaciones reportadas acerca del vínculo entre las SpA y las células T $\gamma\delta$  han relacionado al eje intestino-piel -articulación, al encontrar aumento en la frecuencia de células T $\gamma\delta$  productoras de IL-17 en sangre periférica y líquido sinovial de pacientes con ReA y JIA (Kessel et al., 2017; Chowdhury et al., 2017). En este sentido, se ha planteado que las células T $\gamma\delta$  periféricas al ser activadas pueden migrar y acumularse en las articulaciones induciendo síntomas relacionados con la SpA (De Winter et al., 2019). Particularmente, con experimentos de nuestro grupo de trabajo se observó un conjunto de células T $\gamma\delta$  positivas para la integrina  $\alpha 4\beta 7$  (indicadora de activación intestinal) en la sangre periférica de pacientes con SpA. Estas células mostraron una mayor expresión de los receptores tipo Toll (TLR) 2 y TLR 4 en comparación de las células negativas para la integrina (Romero-López et al., 2020) lo que permite suponer que las células T $\gamma\delta$  pueden ser diferenciadas, activadas en el intestino y migrar a sitios extra-intestinales donde, con la producción de IL-17 e IL-22 pueden ser responsables de enfermedades inflamatorias como las SpA.

Debido la relación de infecciones con la SpA y a que se ha reportado recientemente la existencia de un fenómeno de “memoria inmune innata” o “entrenamiento inmune” (Netea et al., 2016; Placek et al., 2019), es probable que las células T $\gamma\delta$  de estos pacientes sean “entrenadas” durante las infecciones, lo que explicaría su fenotipo activado y pro-inflamatorio durante la enfermedad.

### **Participación de las células T $\gamma\delta$ la memoria inmune innata**

La memoria inmunológica, es un proceso que nos proporciona protección contra patógenos a los cuales ya hemos sido expuestos anteriormente, y está presente principalmente en la respuesta adaptativa a través de células T y B de memoria, que proporcionan señales diferentes a las de sus contrapartes efectoras y proliferar más rápido en respuesta a la exposición al antígeno(Lauvau & Soudja, 2015).

Hasta hace algunos años se creía que la memoria inmunológica estaba restringida a la memoria adaptativa, estudios recientes reportan acercamientos sobre una “inmunidad entrenada” proporcionada por el sistema inmune innato, como una forma de adaptación de los mecanismos de defensa innatos del huésped (Divangahi *et al.*, 2021). Después de exposición a agentes infecciosos particulares, la inmunidad entrenada puede generar una respuesta mayor y más rápida contra un desafío secundario con patógenos homólogos o incluso heterólogos, mejorando su respuesta frente a una infección por patógeno independiente de las células T ó B del sistema inmune adaptativo(Netea *et al.*, 2011). Gracias al descubrimiento de los receptores de reconocimiento de patrón (PRR) como los son los receptores tipo Toll (TLR), receptores de lectina tipo C y a los receptores similares a los tipo NOD (NLR) se ha cambiado el panorama sobre la especificidad nula que se conocía de la inmunidad innata(Netea, 2013). Asimismo, en estudios recientes han identificado poblaciones celulares innatas que presentan características de memoria: neutrófilos, macrófagos, células NK y linfocitos T $\gamma\delta$  (Bowdish *et al.*, 2007; Netea, 2013; Netea *et al.*, 2016; Vivier *et al.*, 2011).

Las células T $\gamma\delta$  al tener la capacidad para expresar NKR y TLR, aunque representan una frecuencia reducida tienen una respuesta rápida generando una respuesta proinflamatoria y posteriormente una de manera única a la inmunidad innata y adaptativa (Carman & Springer, 2003). Además, se ha revelado que las células T $\gamma\delta$  al someterse a una reprogramación funcional después de la exposición a componentes microbianos como el lipopolisacárido (LPS) pueden sobre expresar TLR4 siendo su activador principal(Netea *et al.*, 2016).

Actualmente, se han reportado subconjuntos de células T $\gamma\delta$  que podrían reactivarse en una segunda exposición a un antígeno como lo hacen los linfocitos T convencionales de memoria (Comeau *et al.*, 2020). Estas células T $\gamma\delta$  expresan características de las células de memoria para responder con mayor fuerza y una proliferación de mayor medida tras una infección secundaria (Comeau *et al.*, 2020). Por lo tanto, el estudio de esta de esta población celular y su relación con la memoria inmunológica remonta las primeras investigaciones, donde observaron la respuesta de las células T $\gamma\delta$  frente a una infección por *M. tuberculosis* en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sujetos que habían recibido una vacuna con bacilo de Calmette- Guérin (BCG) y sujetos no vacunados (Hoft *et al.*, 1998), revelando una proliferación y expansión mayor tras una reexposición y experiencia previa con el antígeno.

Asimismo, se realizó un análisis donde se exponen características de memoria en células T $\gamma\delta$  en PBMC de pacientes con infección por citomegalovirus humano (CMV) positivo y con pacientes con CMV negativo, revelando cambios en expresión de un subconjunto de células T $\gamma\delta$  a través de citometría de flujo y la expresión de los marcadores CD45RA-CD45RO (Pitard *et al.*, 2008).

Se han utilizado múltiples herramientas para el estudio y el reconocimiento de la funcionalidad precisa de las células T $\gamma\delta$ , una de las más utilizadas en estudios recientes ha sido la citometría de flujo multiparamétrica, herramienta con la cual se han identificado con mayor precisión subconjuntos de células T $\gamma\delta$  que expresan fenotipos de memoria (Fergusson *et al.*, 2014; Odaira *et al.*, 2016). A través, de múltiples marcadores de reconocimiento celular utilizados en la citometría de flujo multiparamétrica se han identificado células T $\gamma\delta$  con fenotipos de memoria, tal es el caso de un receptor de membrana similar a lectina tipo c, CD161, siendo expresado en niveles elevados por células NK y células T $\gamma\delta$ , y se asocia con la producción de IL-17 mejorada, y una mayor transmigración endotelial (Dieli *et al.*, 2003<sup>a</sup>; Fergusson *et al.*, 2014; Karunathilaka *et al.*, 2022). En este sentido se han revelado análisis donde dividen a las células T $\gamma\delta$  correspondientes a su capacidad de presentar memoria a través de fenotipos positivos o negativos a CD27 una molécula

homodimérica de transmembrana de 120kDa expresada por la mayoría de las células T, B, NK y  $T\gamma\delta$  (Gioia *et al.*, 2002) y a las isoformas de CD45, las cuales distinguen a las células T humanas vírgenes CD45RA y de memoria CD45RO (Gioia *et al.*, 2002), en conjunto CD27 con las isoformas CD45R se han identificado subconjuntos de células  $T\gamma\delta$  y su relación con memoria adquirida: vírgenes (CD27+ CD45R+), de memoria central (CD27+ CD45R-), de memoria efectora (CD27- CD45-) y memoria RA (CD27-CD45+) (Guerra-Maupome *et al.*, 2019; Odaira *et al.*, 2016).

Debido a los antecedentes de esta población celular ( $T\gamma\delta$ ) al ser crucial en destrucción de células infectadas por virus y su función en el sistema inmunológico contra infecciones bacterianas a través de la producción de citocinas como IL-17, nos resulta interesante evaluar esta población celular en pacientes con SpA donde la producción de citocinas específicas como la IL-17 e IL-22 es parte importante de los mecanismos fisiopatológicos correlacionados con la enfermedad.

### **Planteamiento del problema**

Debido al desconocimiento de la patogénesis de la SpA han surgido diversas hipótesis que tratan de explicar la activación aberrante del sistema inmune. Posiblemente, las células  $T\gamma\delta$  tengan una sobreproducción de IL-17 ante estímulos microbianos generados durante infecciones, son capaces de salir a recirculación desde el intestino a las zonas de entesis marcadas por la integrina  $\alpha4\beta7$ , lo que generaría la expresión de un fenotipo de memoria expresado por estas células, lo cual se puede asociar con la inflamación crónica característica de la patogénesis de las SpA, junto a las características clínicas de los pacientes.

### **Hipótesis**

Las células  $T\gamma\delta$  circulantes de pacientes con espondiloartritis tendrán un fenotipo proinflamatorio asociado a la activación intestinal, a la producción de IL-17 y la expresión de marcadores de superficie asociados a memoria inmune innata.

## **Objetivos**

### General

- Evaluar la frecuencia y fenotipo de células T $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7$  productoras de IL-17 con un fenotipo de memoria inmune innata en muestras de sangre de pacientes con SpA.

### Específicos

- Analizar la frecuencia de las células T $\gamma\delta$  positivas a  $\alpha 4\beta 7$ , CD27, CD161 y CD45RO en sangre periférica de pacientes con SpA.
- Comparar la producción de IL-17 en las poblaciones celulares de estudio, distinguiéndolas con los marcadores CD27,  $\alpha 4\beta 7$ , CD161 y CD45RO.

## **Metodología**

Se realizó un estudio transversal, observacional y experimental donde se reclutaron a 3 pacientes con SpA que cumplieron los criterios de clasificación de ASAS (Anexo 4) (Rudwaleit, Landewé, et al., 2009) y que fueron atendidos en el Hospital General de México (HGM).

### Criterios De Inclusión:

1. Pacientes de ambos sexos mayores de 18 años, de cualquier nacionalidad que sean atendidos en el servicio de reumatología del HMG.
2. Pacientes que cuenten con criterios para ser clasificados en axSpA o pSpA.
3. Pacientes con actividad de la enfermedad mayor a 2.1 de acuerdo con la escala ASDAS.
4. Pacientes que acepten participar en el estudio mediante la firma de un formato de consentimiento informado.

### Criterios De Exclusión:

1. Pacientes con el diagnóstico de cáncer, enfermedades autoinmunes no relacionadas con la SpA (Lupus, artritis reumatoide, tiroiditis autoinmune, síndrome de Sjögren, miopatías inflamatorias, etc).
2. Pacientes que cuenten con el diagnóstico de alguna enfermedad inflamatoria o neoplásica activa durante los últimos tres meses.

3. Pacientes que reciban como parte de su tratamiento anticuerpos monoclonales anti-IL-17 o inhibidores de la vía JAK/STAT.

#### Tamaño de la muestra

El cálculo del tamaño de la muestra se determinó con la fórmula de estimación de muestra por proporción utilizando la expresión  $n = \frac{N * Z\alpha^2 * p * q}{e^2 * (N - 1) + Z^2 * p * q}$

-N (Tamaño de la población) = población mexicana 130,000,000

-Zα (coeficiente del nivel de confianza) = 1.96, con un nivel de confianza del 95%

-p = 0.6, probabilidad de éxito, siguiendo la prevalencia de las SpA en México.

-q = 99.4, probabilidad de fracaso

-e = 0.05, error de estimación máximo aceptado por el investigador

$$\text{Por lo tanto, } n = \frac{130000000 * 1.96^2 * 0.006 * 0.994}{0.05^2 * (130000000 - 1) + 1.96^2 * 0.006 * 0.994} = \frac{2996448}{325000.0204} = 9.21$$

De acuerdo con el resultado calculado, se sugiere una muestra mínima de 10 pacientes.

Dada la complejidad del número de variables analizadas, se presentan resultados del análisis de tres muestras de pacientes, lo que proporciona resultados preliminares que se continuarán en un trabajo de tesis de maestría en ciencias.

#### **Evaluación clínica**

En la consulta médica se explicó a los pacientes el objetivo del estudio, se les solicitó la firma de un formato de consentimiento informado y se recopilaron las siguientes variables clínicas (Anexo 1, 2 y 3): edad, sexo, comorbilidades, tratamiento de las comorbilidades, diagnóstico, antecedentes relacionados con la enfermedad, síntomas y signos actuales y pasados, criterios de ASAS (Anexo 4), cumplidos para ser clasificado en axSpA o pSpA, tiempo de evolución, edad al diagnóstico, tratamiento actual, escala BASDAI (Anexo 9), escala ASDAS (Anexo 5), grado de sacroilitis en radiografía simple de acuerdo con los criterios de New York, la presencia o ausencia de edema óseo, sindesmofitos, puentes óseos e inflamación en la resonancia magnética nuclear de articulaciones sacroilíacas o de pies entre otras variables que permiten un mejor diagnóstico.

Posteriormente, se les tomó una muestra de sangre periférica. Las muestras de estos pacientes fueron comparadas con muestras obtenidas de sujetos sanos.

Estas muestras fueron procesadas en el laboratorio para identificar la expresión de citocinas de memoria inmune innata por parte de estas células mediante citometría de flujo. Se midió la expresión de moléculas relacionadas con la memoria inmunológica innata como CD3, TCR $\gamma\delta$ ,  $\alpha\beta$ 7, CD27, CD45RO, CD161, IL-17 e IL-22 en células T  $\gamma\delta$  usando el panel que se muestra a continuación. El volumen de cada anticuerpo fue calculado mediante la titulación de cada uno de ellos.

FLUOROCROMO	MARCADOR	CLONA	VOLUMEN	FABRICANTE
FITC	CD3	OKT3	1 $\mu$ L	BioLegend
BV421	TCR $\gamma\delta$	B1	5 $\mu$ L	BioLegend
PE	$\alpha\beta$ 7	DATK32	2.5 $\mu$ L	BD Biosciences
PACIFIC BLUE	CD27	M-T271	2.5 $\mu$ L	BioLegend
ALEXAFLUOR 700	CD45RO	UCHL1	2.5 $\mu$ L	BioLegend
BV711	CD161	DX12	2.5 $\mu$ L	BD Horizon
APC	IL-17	BL168	2.5 $\mu$ L	BioLegend
PE/CY7	IL-22	2G12A41	2.5 $\mu$ L	BioLegend

**Tabla 1. Panel de tinción por citometría de flujo.**

Fluorocromo	Marcador	Clona	Volumen	Fabricante
FITC	HLA-B27	HLA-ABC-M3	1 $\mu$ L	ThermoFisher

**Tabla 2. Panel de tinción para identificación de HLA-B27 positivo por citometría de flujo.**

Todos los resultados del perfil de citocinas y poblaciones celulares encontrados en estos pacientes fueron correlacionados con el tiempo de evolución y la actividad de la enfermedad en cada paciente.

### Procedimiento

Recopilados los datos clínicos, se solicitó a los pacientes la toma de una muestra de sangre de 10 mL en tubos Vacutainer® con heparina. Estas muestras fueron

identificadas con una clave que permita mantener la privacidad de los pacientes, y fue trasladada al laboratorio para su análisis.

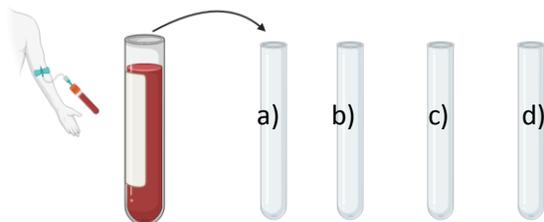
#### Determinación de la positividad para HLA-B27

Se usaron 100µL de sangre de los pacientes reclutados en un tubo para citometría. Se añadió 1 µL del marcador para HLA-B27, se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y se lisaron los eritrocitos con amortiguador FACS Lysing®. Posteriormente se lavaron con regulador de tinción (PBS + 0.5% BSA + 0.25% azida de sodio) y se re-suspendieron en 100µL de regulador de tinción.

#### Estimulación celular

Se colocaron 100µL de sangre en 4 tubos de poliestireno (figura 1), a) “AF”, refiere a auto fluorescencia la cual no se teñirá con ningún marcador, pero seguirá el procedimiento de fijación y permeabilización, b) “4 horas”, refiere a una tinción completa con los marcadores que se realizó en cuanto la muestra llegó al laboratorio, c) “24 horas” refiere a una muestra control incubada 24 hrs/37 C° (a las 20 horas se les añadió Golgi stop para la determinación de citocinas), d) “LPS” refiere al cuarto tubo al cual se le añadió 10 µL (10,000 ng) de LPS de *Escherichia coli* (1 g/ µL) previamente preparado para activación celular en cuanto la muestra llegó al laboratorio (incubada 24 hrs/37 C° a las 20 horas se les añadió Golgi stop).

#### Estimulación celular y tinción de muestra



- a) AF **Autofluorescencia**
- b) 4 horas (**Tinción total teñida a las 4 horas después de la toma de muestra**)
- c) 24 horas (**Tinción total teñida a las 24 horas después de la toma de muestra, incubada a 37°C**)
- d) LPS (**Muestra activada con LPS a las 4 horas después de la toma, se incubó 24 hrs a 37°C y posteriormente se realizó tinción completa**)

Figura 1. Procedimiento resumido de para posterior análisis en citómetro.

**En adelante los cuatro tubos seguirán el mismo procedimiento.**

### Tinción superficial

Se colocaron 100µL de sangre en 4 tubos de poliestireno de acuerdo con la figura y se incubaron por 15 minutos con los anticuerpos CD3, TCRγδ, α4β7, CD27, CD161 y CD45RO en la oscuridad, al término, se lisaron los eritrocitos y se fijó la muestra usando el regulador FACS Lysing ®, posterior, se realizaron dos lavados con regulador de tinción. Después se permeabilizaron con 2mL de regulador de permeabilización (eBiosciences®) 1x y se centrifugaron a 500 xg por 5 minutos a temperatura ambiente.

### Tinción intracelular

Se agregaron 100 µl de regulador de permeabilización, y se realizó la tinción las células con el anticuerpo IL-17, se incubaron 15 minutos en oscuridad, después se añadieron 2 mL de regulador de permeabilización 1x, se centrifugaron 500 xg por 5 minutos a temperatura ambiente, finalmente, se re-suspendieron las células en 300 µl de regulador de tinción y se analizaron las poblaciones celulares en el citómetro de flujo.

### **Análisis de datos**

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism 8. Se determinó la normalidad de los datos con la prueba de Shapiro-Wilks, los datos normales se compararon mediante la prueba T de Student, los datos que no pasaron la prueba de normalidad se compararon con los datos de la prueba de U de Mann-Whitney para grupos pareados; posteriormente se utilizó la prueba ANOVA para el análisis de grupos no pareados para todos los marcadores. Se evaluaron las frecuencias de células T gamma delta con un fenotipo de memoria inmune innata en muestras de sangre total de los pacientes.

### **Aspectos de ética y bioseguridad**

1. Este trabajo fue aprobado por el comité de ética y bioseguridad del Hospital General de México con el número de registro DI/17/404-A/05/040.
2. Se obtuvieron muestras biológicas de aquellos pacientes que acudieron a consulta médica del servicio de Reumatología del Hospital General de México, que

cumplieron con los criterios de inclusión y que, habiendo leído y firmado la carta de consentimiento informado, aceptaron su participación en el estudio.

La consulta médica, llenado de formatos de recolección de datos y toma de muestra de sangre venosa se realizó en el consultorio 27 del servicio de reumatología del H.G.M. La muestra sanguínea se obtuvo mediante un sistema de recolección al vacío con previa asepsia con etanol al 70% por el médico pasante de servicio social Alan Mauricio Villaseñor García. Las muestras recolectadas se rotularon con las iniciales del paciente, fecha y hora de obtención de la muestra.

3.Los residuos peligrosos biológico-infecciosos se depositaron en recipientes rígidos de polipropileno rojos y se desecharon según lo que indica la NOM-087-ECOL.- SSA1-2000.

4.Las muestras obtenidas fueron rotuladas con las características antes mencionadas y se almacenaron en contenedores de plástico con hielo en un periodo menor de 4 horas de la extracción en un vehículo particular, de acuerdo con lo establecido en las normas oficiales mexicanas: NOM-087-ECOL-SSA1-2002 y NOM- 253-SSA1-2012. Finalmente, las muestras obtenidas con los cuidados antes mencionados fueron transportadas en un contenedor con hielo al laboratorio 4/A4 de la FES Iztacala. Los responsables del envío de las muestras desde el H.G.M. fueron el Dr. Julio César Casasola Vargas y el Dr. Rubén Burgos Vargas. Los responsables del transporte de las muestras a la FES Iztacala y el almacenamiento en el laboratorio 4/A4 fueron Héctor Adán Romero García y José Pablo Romero López.

5.La prevención de exposiciones al material biológico estuvieron en consideración el uso de guantes de látex, cubrebocas, bata de laboratorio y el manejo de residuos con las características antes mencionadas

## **Resultados**

### **Datos demográficos y clínicos**

Se realizó el reclutamiento de 3 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión para SpA, los cuales fueron diagnosticados por el médico encargado en el

consultorio de reumatología del HGM, dentro de las variables demográficas y clínicas (tabla 3 y 4) se determinó su diagnóstico positivo a SpA, con tiempo de evolución variable ( $7.6 \pm 8.7$  años), su positividad para el alelo HLA-B27, valores de índices para las SpA (ASDAS-PCR, BASFI, BASDAI y ASAS) (Tabla 3), así como, manifestaciones extracurriculares, número de articulaciones afectadas, tratamiento actual, donde los 3 pacientes estaban bajo un tratamiento en curso, tiempo de evolución y su clasificación actual (axial o periférica) (Tabla 4)

Nombre	Sexo	Edad (años)	Comorbilidades	Síntomas actuales	Diagnóstico	HLA-B27	ASDAS-PCR	BASFI	BASDAI
<b>HBR</b>	F	63	Neuropatía intersticial/ Hipertensión arterial sistémica	Lumbalgia	Espondilitis anquilosante con neuropatía intersticial	Positivo	3.6	6.5	5.2
<b>PREM</b>	M	20	Negadas	Artritis, entesitis, dactilitis, limitación de la movilidad	Espondiloartritis axial y periférica	Positivo	3.9	9.7	8.9
<b>RYPS</b>	M	30	Negadas	Lumbalgia	Espondiloartritis axial no radiográfica y periférica	Positivo	1.3	1.2	N/A
<b>Resumen</b>	M:2 F:1	36.7± 18.3	-	-	-	100% positivos	2.9 ±1.16	5.8±3.5	4.7±3.6

**Tabla 3. Variables demográficas y clínicas de pacientes reclutados.** M= masculino, F= femenino, resumen mostrado en media  $\pm$  desviación estándar

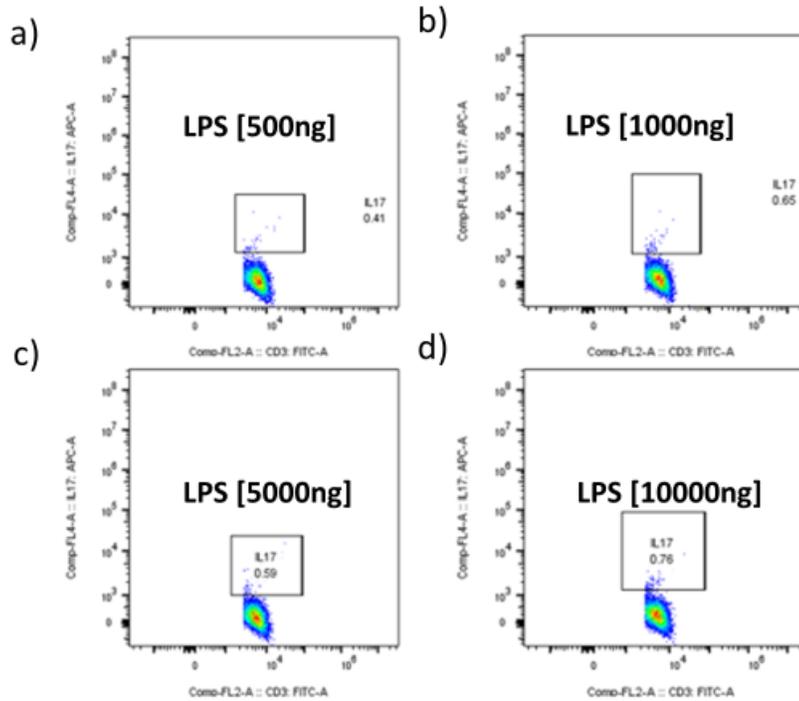
Nombre	Manifestaciones extraarticulares	# de articulaciones afectadas	Tratamiento actual	Criterios ASAS	Axial / Periférica	Tiempo de evolución (años)
<b>HBR</b>	Neuropatía intersticial	1	Sulfasalazina/ indometacina	Positivos para modalidad clínica y de imagen	Axial	20 años

<b>PREM</b>	Ninguna	3	Sulfazalazina/ esteroide/ infiximab	Positivos para modalidad clinica y de imagen	Axial y periférica	2 años
<b>RYPs</b>	Ninguna	1	Sulfazalazina/ Esomeprazol/ Malival compuesto	Positivos para modalidad clinica y de imagen	Axial y periférica	1 año
<b>Resumen</b>	-	1.6 ±0.9	-	-	Axial: 3 Periférica: 3	7.6 ± 8.7

**Tabla 4. Información complementaria de las variables demográficas y clínicas de pacientes reclutados**

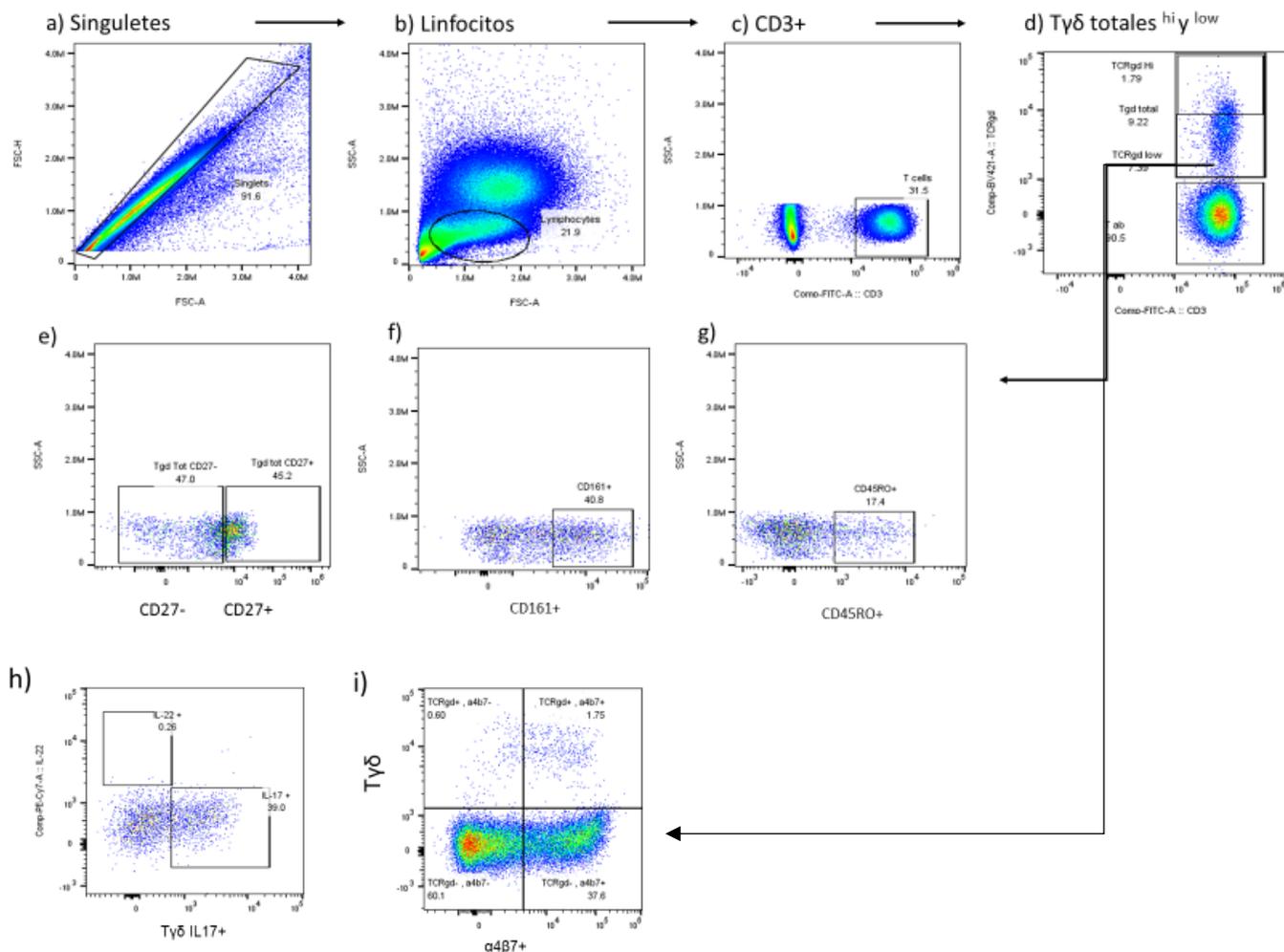
#### **Estimulación celular y algoritmo de análisis.**

Para la estimulación de un tubo experimental (tubo d, Figura 1) se estandarizó la concentración adecuada del uso del LPS de *E. coli* en muestras de sangre periférica de pacientes reclutados, se probaron 4 concentraciones, 500 ng, 1000ng, 5000 ng, 10000 ng, siendo esta ultima la mejor para observar la expresión de IL-17.



**Figura 2.** Determinación de la concentración para activación celular con LPS en sangre periférica de los pacientes reclutados. a) 500 ng/mL, b) 1000 ng/mL, c) 5000 ng/mL y d) 10000 ng/mL.

Usando controles de fluorescencia menos uno (FMO), se diseñó la estrategia de análisis por citometría de flujo para la sangre de los pacientes y controles (Figura 3).

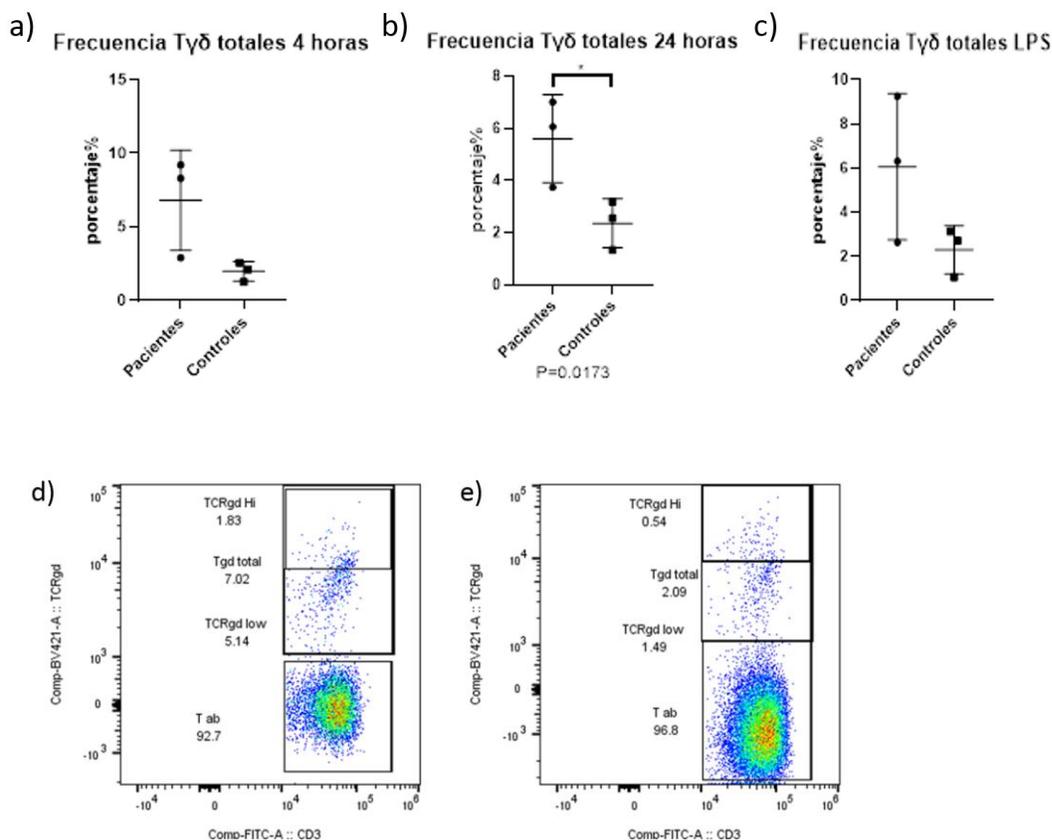


**Figura 3.** Estrategia de análisis por citometría de flujo para la sangre de los pacientes y controles. A través de un algoritmo supervisado, primero se realizó un gate de eventos únicos (singuletes a través de una gráfica mostrando FSC-H vs FSC-A (a)). Luego, se escogió a la población de linfocitos de una gráfica que compara SSC-A vs FSC-A (b). Posteriormente se eligieron los eventos de linfocitos CD3+ (c), subsecuentemente a eventos de células T  $\gamma\delta$ + (d). De cada una de las poblaciones CD3+  $\gamma\delta$ + se determinaron poblaciones con mayor expresión del TCR $\gamma\delta$  T  $\gamma\delta$  ( $^{hi}$ ) y con menor expresión del mismo T  $\gamma\delta$  ( $^{low}$ ) (d), además de su positividad a la integrina  $\alpha 4\beta 7$  (i). En este sentido, se analizaron las poblaciones T  $\gamma\delta$ +CD27+ (e), T  $\gamma\delta$ + CD45RO+ (g), T  $\gamma\delta$ + CD161+ (f) y se realizó un gate en las poblaciones positivas a la integrina  $\alpha 4\beta 7$ . De las poblaciones de células T  $\gamma\delta$ + totales, T  $\gamma\delta$ +  $^{hi}$ , T  $\gamma\delta$ +  $^{low}$ , T  $\gamma\delta$ +  $\alpha 4\beta 7$ +, T  $\gamma\delta$ +CD27+, T  $\gamma\delta$ + CD45RO+, T  $\gamma\delta$ + CD161+ se determinaron las poblaciones positivas a la IL-17 (h).

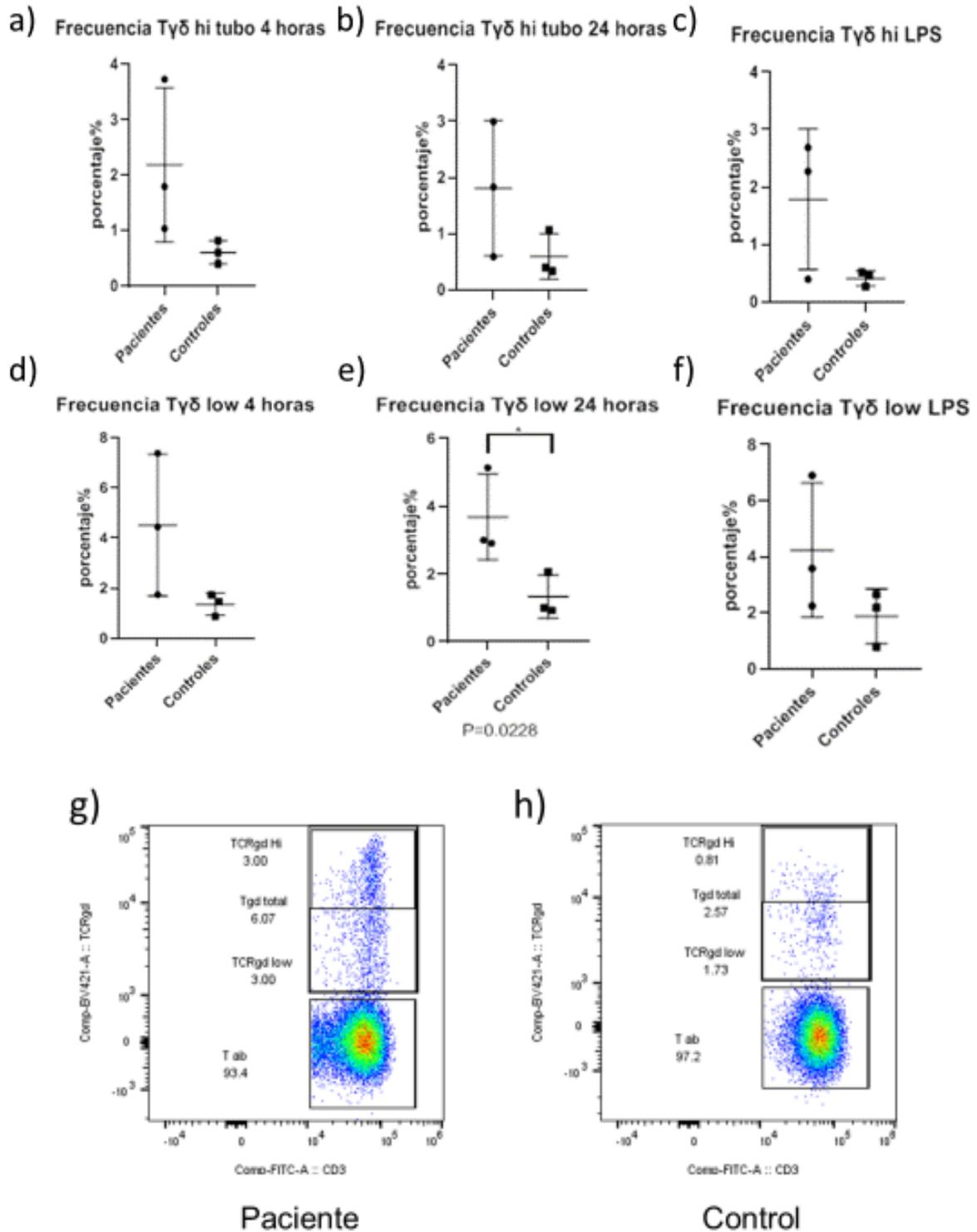
### Análisis de muestras de sangre por citometría de flujo en pacientes y controles

En el análisis de sangre total de 3 pacientes con SpA pareados con 3 individuos sanos con características demográficas similares, se encontró aumento el

porcentaje de células T  $\gamma\delta$  totales de los pacientes en los 3 tubos teñidos, con significancia en el tubo con incubación de 24 horas ( $P=0.0173$ ) (Figura 4b). Debido a su comportamiento distinto se dividieron las células T  $\gamma\delta$  en mayor ( $^{hi}$ ) y menor expresión ( $^{low}$ ) del TCR $\gamma\delta$  (Figura 4d y e), en los T  $\gamma\delta^{hi}$  no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas a diferencia de las T  $\gamma\delta^{low}$  con significancia en el tubo con incubación de 24 horas ( $P=0.0228$ ) (Figura 5e). Dentro de los valores de las células T  $\gamma\delta$  totales,  $^{hi}$  y  $^{low}$  no se encontraron diferencias para la expresión de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  entre pacientes y controles (Figura 6).

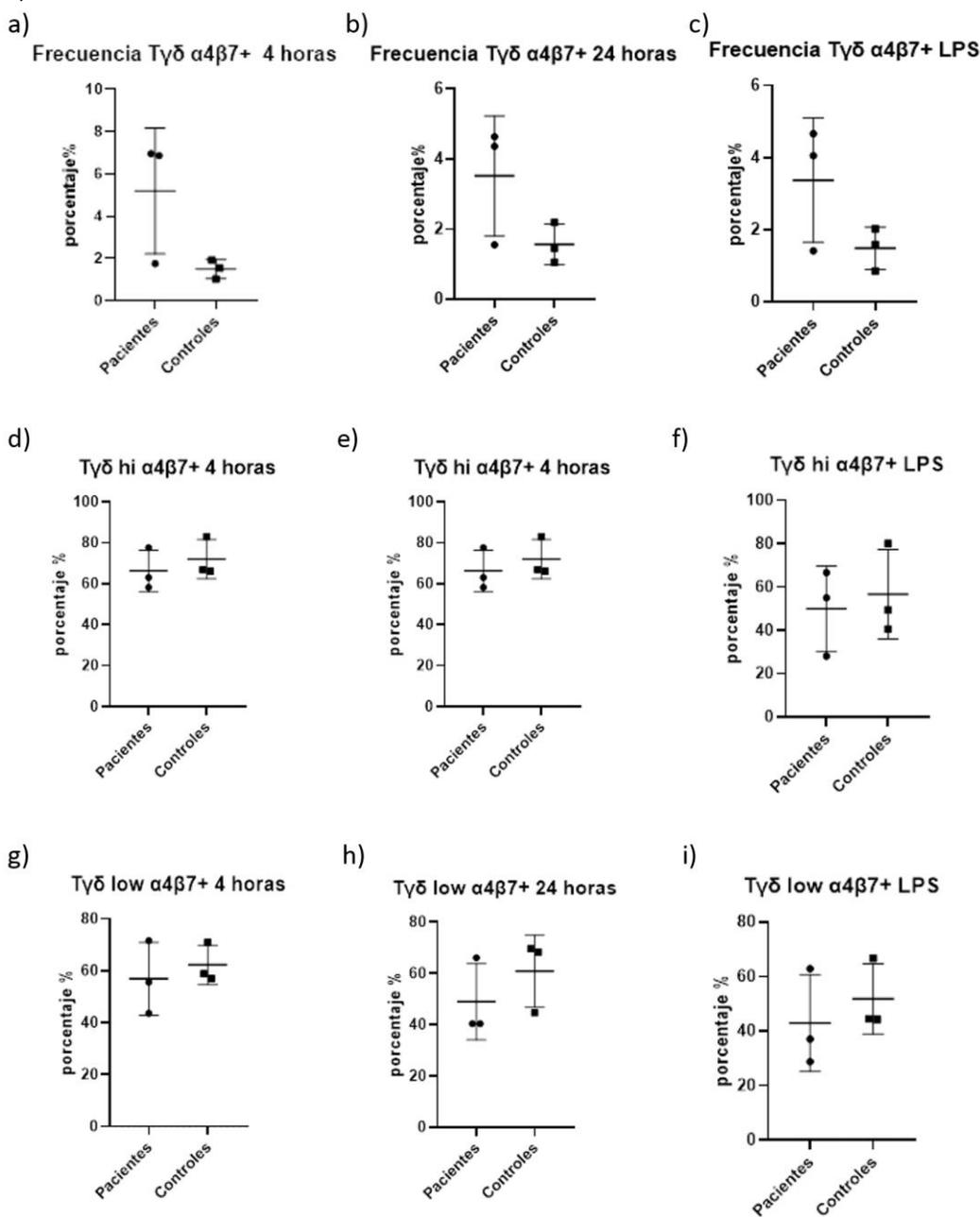


**Figura 4.** Porcentaje de células T  $\gamma\delta$  totales de pacientes comparados con controles (sujetos sanos). a) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra), b) muestra incubada 24hrs/37°C, c) LPS (muestra activada con 10000 ng de LPS por 24 hrs). d) y e) Dot plots representativos que muestran los gates del porcentaje total de células T  $\gamma\delta$  totales d) pacientes y e) controles.



**Figura 5.** Porcentaje de los subconjuntos de células T  $\gamma\delta$  totales (T  $\gamma\delta$  <sup>hi</sup> y T  $\gamma\delta$  <sup>low</sup>) de pacientes comparados con controles (sujetos sanos). a) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra) de las T  $\gamma\delta$  <sup>hi</sup>, b) muestra incubada 24hrs/37°C, de las T  $\gamma\delta$  <sup>hi</sup>, c) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS por 24 hrs) de las T  $\gamma\delta$  <sup>hi</sup>. d) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de

obtención de la muestra) de las T  $\gamma\delta^{\text{low}}$ , e) ctrl (muestra incubada 24hrs/37°C) de las T  $\gamma\delta^{\text{low}}$ , f) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS por 24 hrs) de las T  $\gamma\delta^{\text{low}}$ . g) y h) Dot plots representativos que muestran los gates del porcentaje total de células T  $\gamma\delta^{\text{hi}}$  g) pacientes y h) controles.

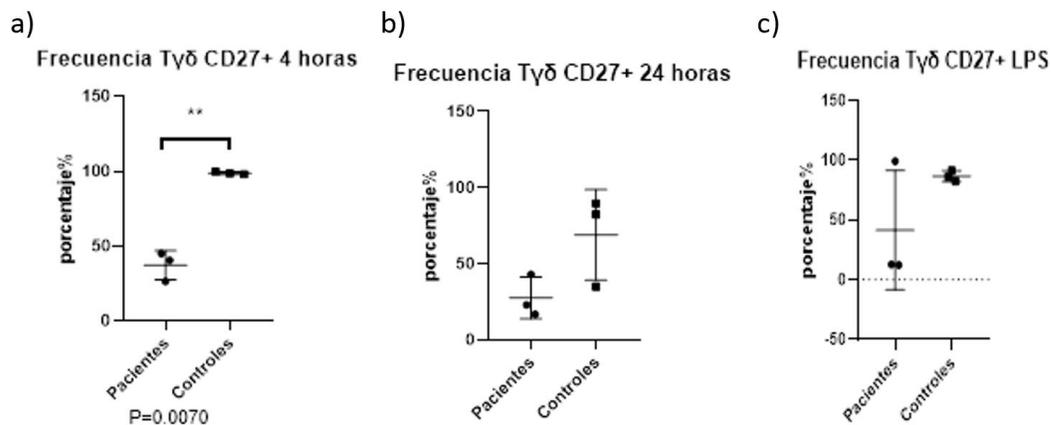


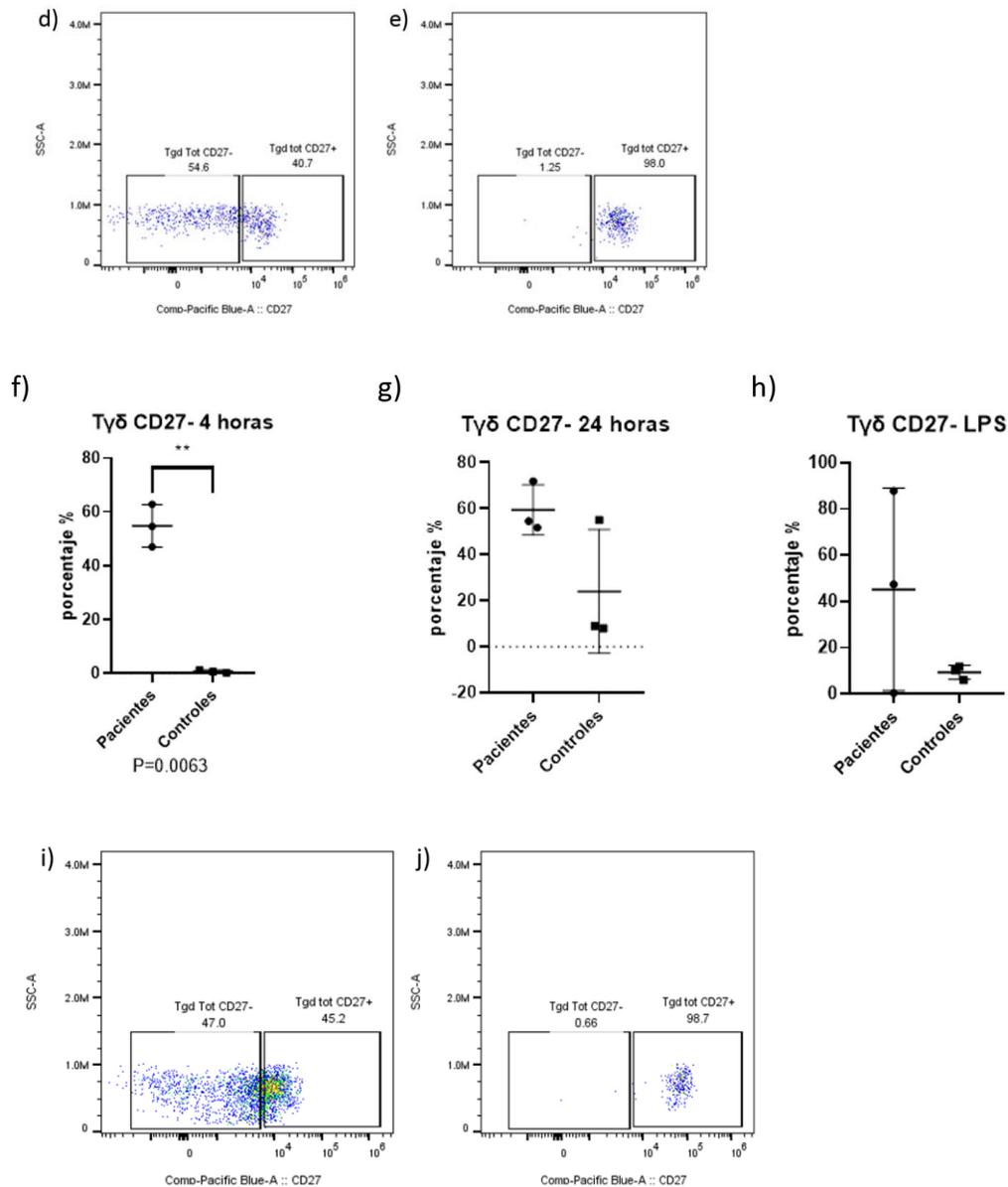
**Figura 6.** Porcentaje de las células T  $\gamma\delta$  totales y sus subconjuntos T  $\gamma\delta^{\text{hi}}$  y T  $\gamma\delta^{\text{low}}$  positivas a la integrina  $\alpha 4\beta 7$  de pacientes comparados con controles (sujetos sanos). a) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra) de las T  $\gamma\delta$  totales  $\alpha 4\beta 7+$ , b) muestra incubada 24hrs/37°C de las T  $\gamma\delta$  totales  $\alpha 4\beta 7+$ , c) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS) de las T  $\gamma\delta$  totales  $\alpha 4\beta 7+$ . d) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra) de las T  $\gamma\delta^{\text{hi}}$   $\alpha 4\beta 7+$ , e) muestra incubada 24hrs/37°C, de las T  $\gamma\delta^{\text{hi}}$   $\alpha 4\beta 7+$ , f) LPS (muestra

activada con 10000ngde LPS) de las T  $\gamma\delta^{hi}$   $\alpha 4\beta 7+$ . g) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra) de las T  $\gamma\delta^{low}$   $\alpha 4\beta 7+$ , h) muestra incubada 24hrs/37°C de las T  $\gamma\delta^{low}$   $\alpha 4\beta 7+$ , i) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS) de las T  $\gamma\delta^{low}$   $\alpha 4\beta 7+$ .

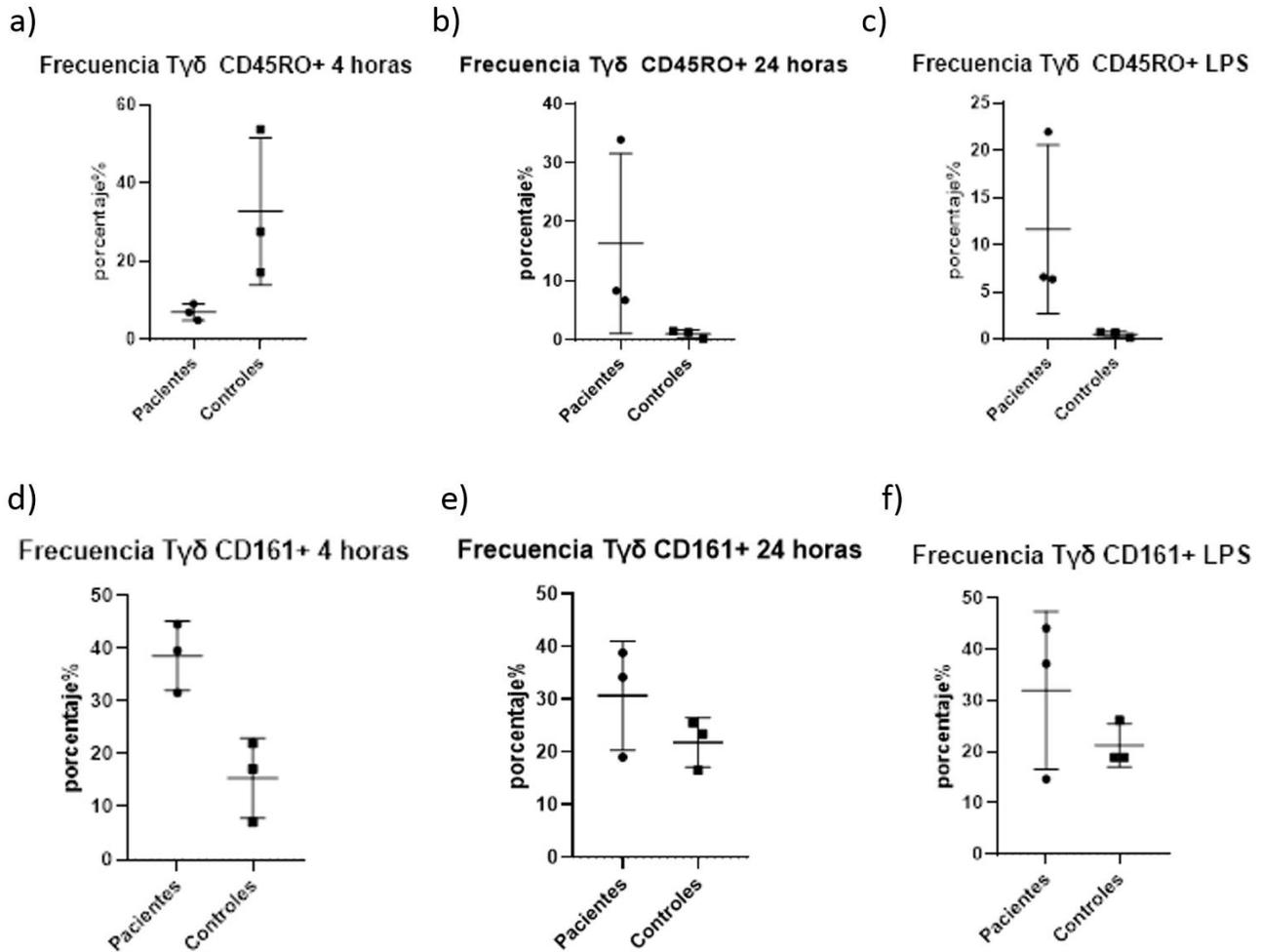
En el análisis de las células T  $\gamma\delta$  positivas a los marcadores CD27, CD161+ y CD45RO+,y negativas a CD27, se observó una tendencia interesante en las T  $\gamma\delta$  CD27+ disminuidas en los pacientes a diferencia de los controles (P=0.0070) del tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (Figura 7 a), en el caso de las T  $\gamma\delta$  CD27-, están aumentadas en los pacientes (P=0.0063) en el tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (Figura 7f), siendo nulas las T  $\gamma\delta$  CD27- de los controles. Las células T  $\gamma\delta$  CD161+, T  $\gamma\delta$  CD45RO+ no mostraron diferencias significativas en los 3 tubos (Figura 8).

Además del análisis de frecuencia para las poblaciones totales, se obtuvo la expresión de la integrina  $\alpha 4\beta 7$ , observado a las T  $\gamma\delta$  CD27+  $\alpha 4\beta 7+$  disminuidas en los pacientes a diferencia de los controles (P=0.0142) en el tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (Figura 9 a), por otra parte las T  $\gamma\delta$  CD27-  $\alpha 4\beta 7+$  están aumentadas en los pacientes (P=0.0187) en el tubo teñido el mismo día de la toma de muestra (Figura 9f), Las células T  $\gamma\delta$  CD161+ y T  $\gamma\delta$  CD45RO+ no mostraron diferencias significativas en los 3 tubos respecto a la expresión de la integrina  $\alpha 4\beta 7$ (Figura 10).



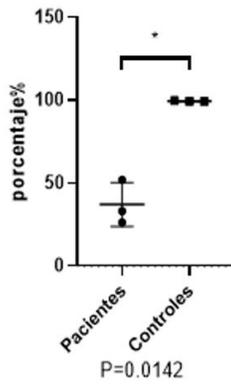


**Figura 7.** Porcentaje de las células T  $\gamma\delta$  totales CD27+ positivas y CD27- negativas, pacientes comparados con controles (sujetos sanos). a) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñido el día de obtención de la muestra) de las T  $\gamma\delta$  CD27+, b) muestra incubada 24hrs/37°C, de las T  $\gamma\delta$  CD27+, c) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS) T  $\gamma\delta$  CD27+, d) y e) Dot plots representativos que muestran los gates del porcentaje total de células T  $\gamma\delta$  CD27+, d) pacientes y e) controles. f) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñido el día de obtención de la muestra) de las T CD27-, g) muestra incubada 24hrs/37°C, de las T CD27-, h) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS) de las T CD27-. i) y j) Dot plots representativos que muestran los gates del porcentaje total de células T T CD27- i) pacientes y j) controles.

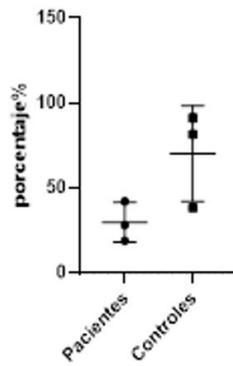


**Figura 8.** Porcentaje de las células T  $\gamma\delta$  totales CD45RO+ positivas y, T  $\gamma\delta$  totales CD161+ positivas de pacientes comparados con controles (sujetos sanos). a) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra) de las T  $\gamma\delta$  totales CD45RO+ b) muestra incubada 24hrs/37°C, de las T  $\gamma\delta$  totales CD45RO+, c) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS) T  $\gamma\delta$  totales CD45RO+ , d) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra) de las CD161+ , e) muestra incubada 24hrs/37°C, de las CD161+, f) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS) CD161+.

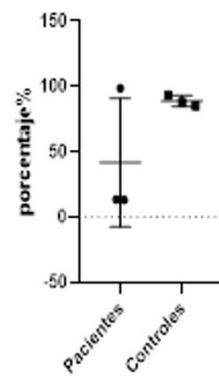
a)

Frecuencia  $T\gamma\delta$  CD27+ $\alpha 4\beta 7+$  4 horas

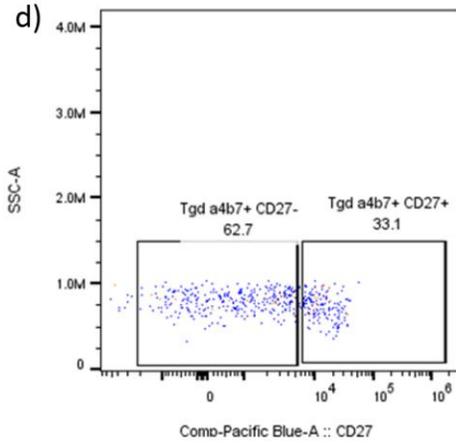
b)

Frecuencia  $T\gamma\delta$  CD27+ $\alpha 4\beta 7+$  24 horas

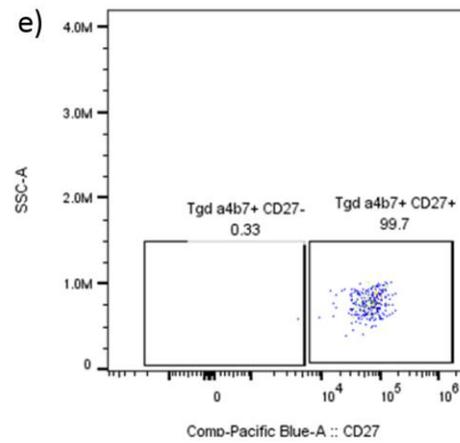
c)

Frecuencia  $T\gamma\delta$  CD27+ $\alpha 4\beta 7+$  LPS

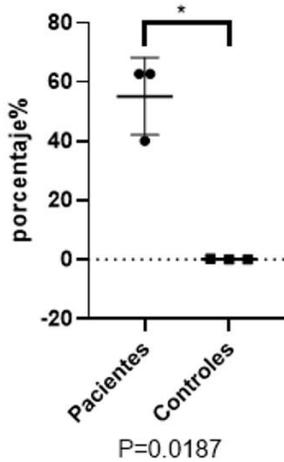
d)



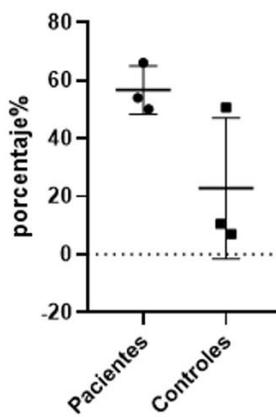
e)



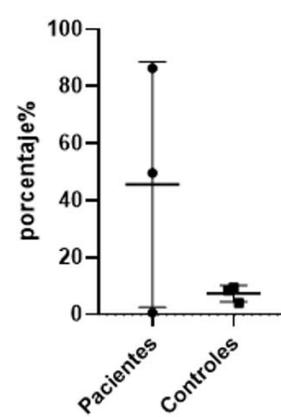
f)

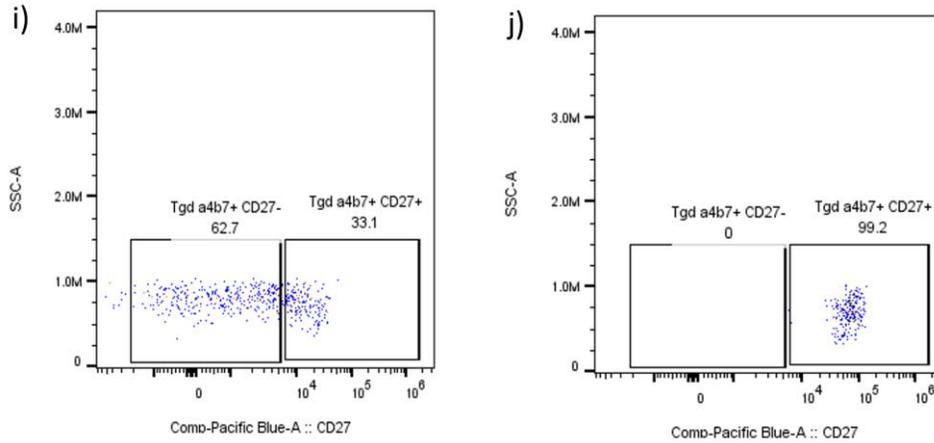
 $T\gamma\delta$  CD27-  $\alpha 4\beta 7+$  4 horas

g)

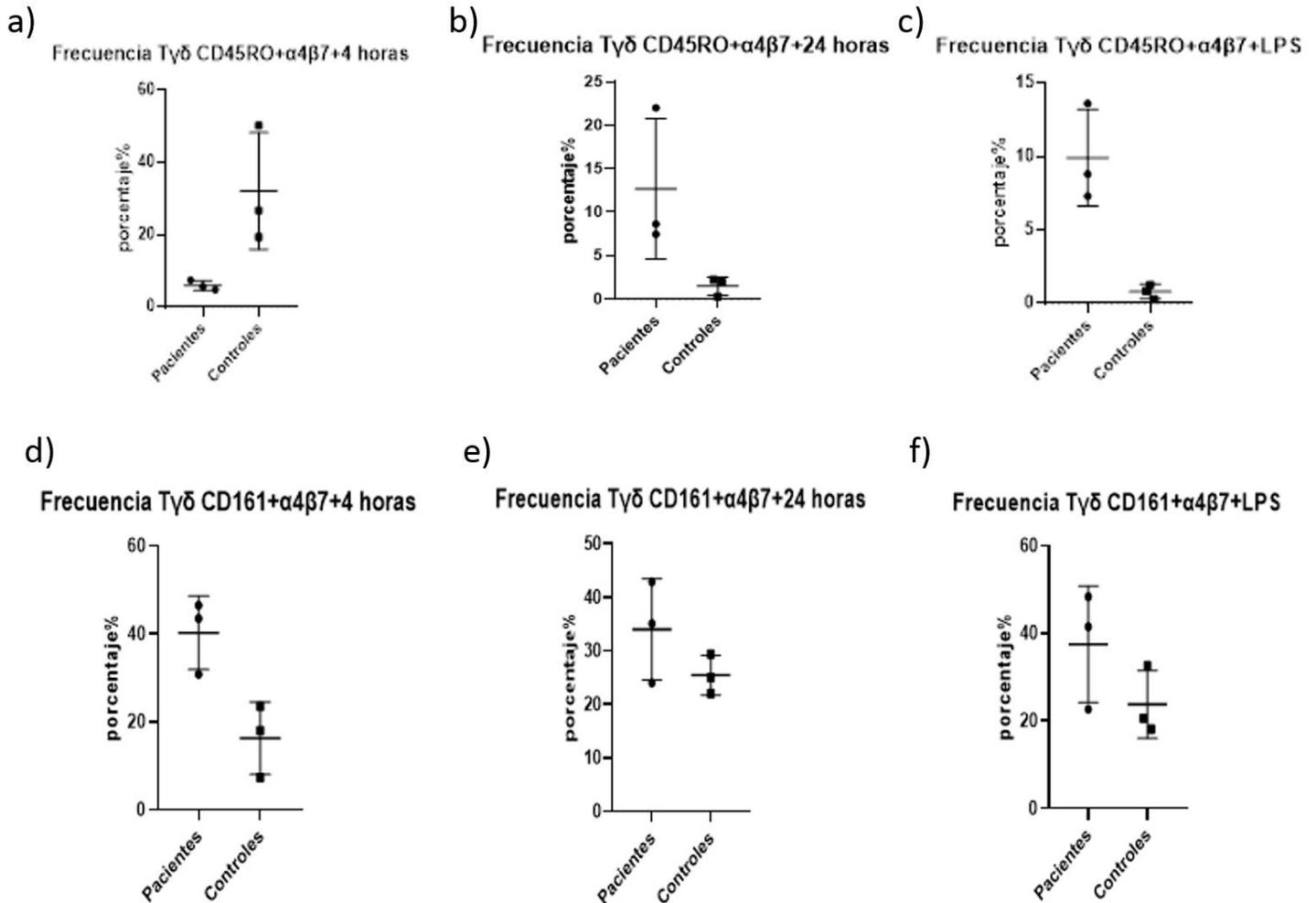
 $T\gamma\delta$  CD27-  $\alpha 4\beta 7+$  24 horas

h)

 $T\gamma\delta$  CD27-  $\alpha 4\beta 7+$  LPS

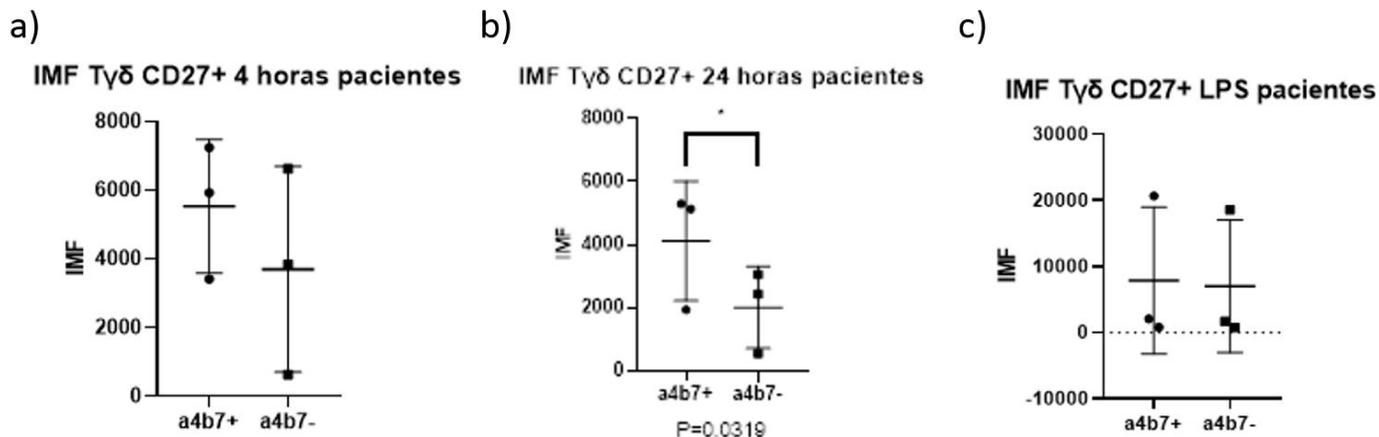


**Figura 9.** Porcentaje de las células T  $\gamma\delta$  totales CD27+ positivas y CD27- negativas, y a su vez, positivas a la integrina  $\alpha 4\beta 7+$ , pacientes comparados con controles (sujetos sanos). a) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra) de las T  $\gamma\delta$  CD27+  $\alpha 4\beta 7+$ , b) muestra incubada 24hrs/37°C, de las T  $\gamma\delta$  CD27+  $\alpha 4\beta 7+$ , c) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS) T  $\gamma\delta$  CD27+  $\alpha 4\beta 7+$ , d) y e) Dot plots representativos que muestran los gates del porcentaje total de células T  $\gamma\delta$  CD27+  $\alpha 4\beta 7+$ , d) pacientes y e) controles. f) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra) de las T CD27-  $\alpha 4\beta 7+$ , g) muestra incubada 24hrs/37°C, de las T CD27-  $\alpha 4\beta 7+$ , h) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS) de las T CD27-  $\alpha 4\beta 7+$ . i) y j) Dot plots representativos que muestran los gates del porcentaje total de células T CD27-  $\alpha 4\beta 7+$  i) pacientes y j) controles.

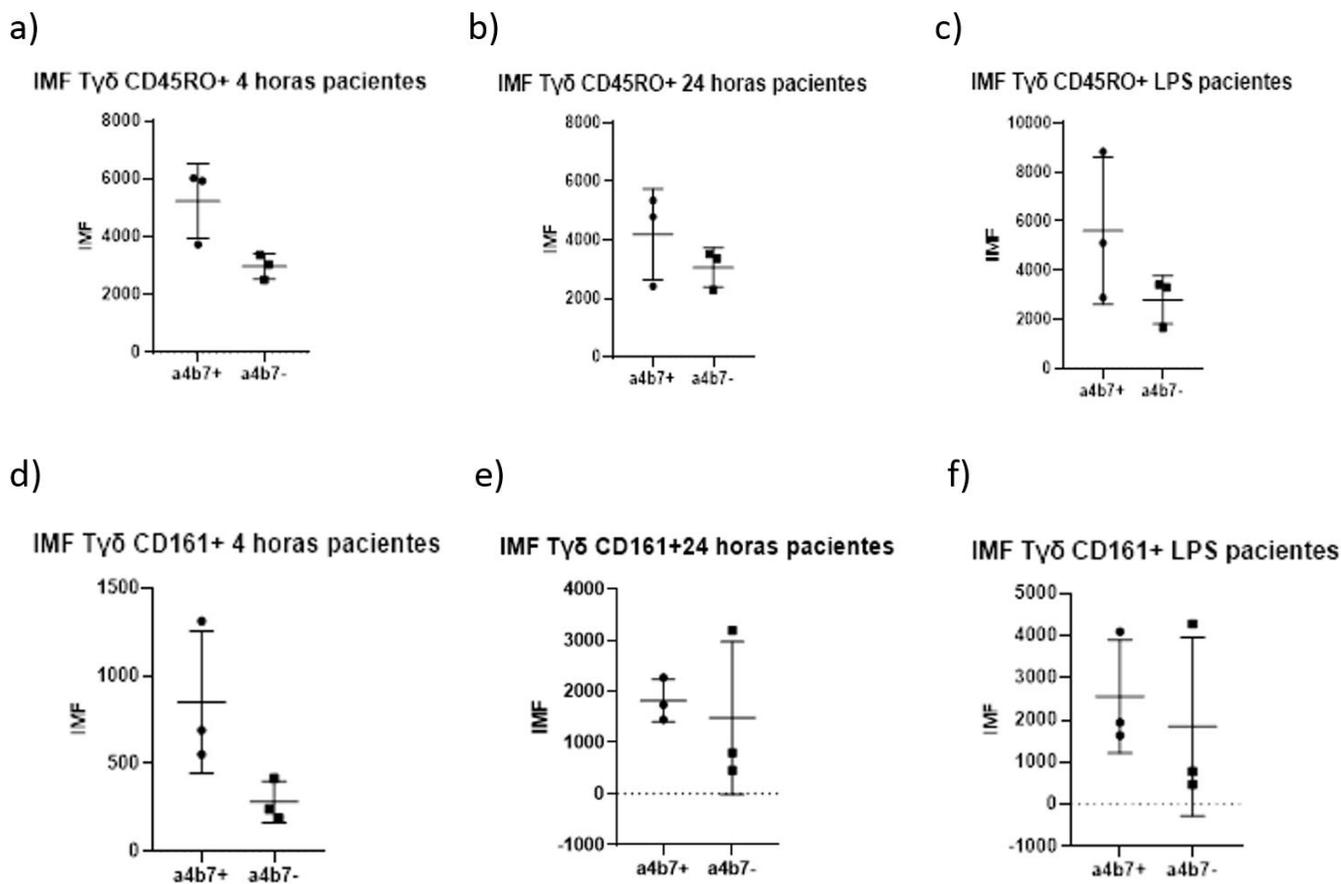


**Figura 10.** Porcentaje de las células T  $\gamma\delta$  totales CD45RO+ positivas y, T  $\gamma\delta$  totales CD161+ positivas, y a su vez, positivas a la integrina  $\alpha 4\beta 7+$ , de pacientes comparados con controles (sujetos sanos). a) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra) de las T  $\gamma\delta$  totales CD45RO+  $\alpha 4\beta 7+$ , b) muestra incubada 24hrs/37°C, de las T  $\gamma\delta$  totales CD45RO+  $\alpha 4\beta 7+$ , c) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS) T  $\gamma\delta$  totales CD45RO+  $\alpha 4\beta 7+$ , d) tubo día (teñida el día de obtención de la muestra) de las CD161+  $\alpha 4\beta 7+$ , e) 24 horas (muestra incubada 24hrs/37°C) de las CD161+  $\alpha 4\beta 7+$ , f) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS) CD161+  $\alpha 4\beta 7+$ .

En el análisis de la intensidad media de fluorescencia de CD27, CD45RO y CD161 positivas en las poblaciones T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7+$  y en las poblaciones  $\alpha 4\beta 7-$  positivas, se observó a la población T  $\gamma\delta$  CD27+ con una expresión significativa para la integrina  $\alpha 4\beta 7$  (P=0.0319) en el tubo con incubación de 24 horas (Figura 11b). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de la  $\alpha 4\beta 7+$  y  $\alpha 4\beta 7-$  para las demás poblaciones positivas en ninguno de los 3 tubos (Figura 12).

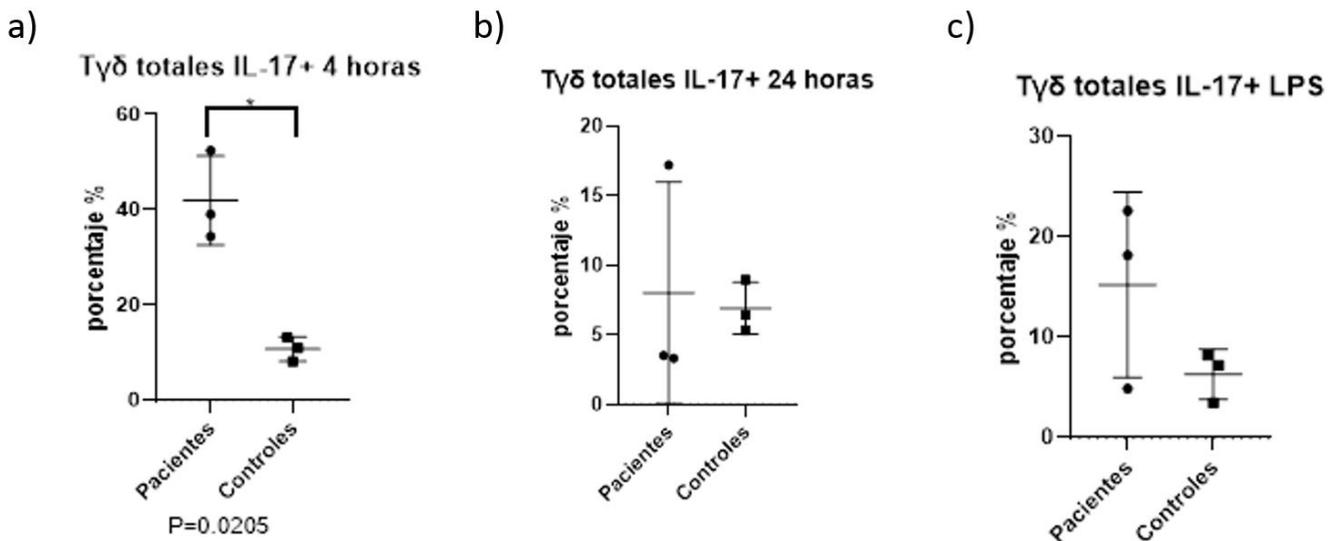


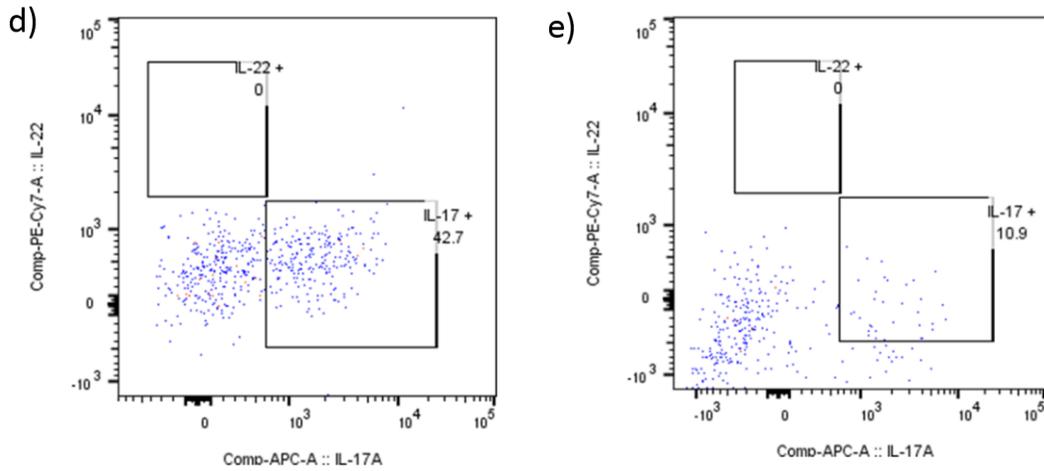
**Figura 11.** Intensidad media de fluorescencia de CD27+ en las células T  $\gamma\delta$   $\alpha\beta$ 7+ y T  $\gamma\delta$   $\alpha\beta$ 7- , en pacientes. a) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra) de las T  $\gamma\delta$   $\alpha\beta$ 7+ vs T  $\gamma\delta$   $\alpha\beta$ 7- b) muestra incubada 24hrs/37°C, de las T  $\gamma\delta$  CD27+  $\alpha\beta$ 7+ vs T  $\gamma\delta$   $\alpha\beta$ 7- c) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS) T  $\gamma\delta$   $\alpha\beta$ 7+ vs T  $\gamma\delta$   $\alpha\beta$ 7-



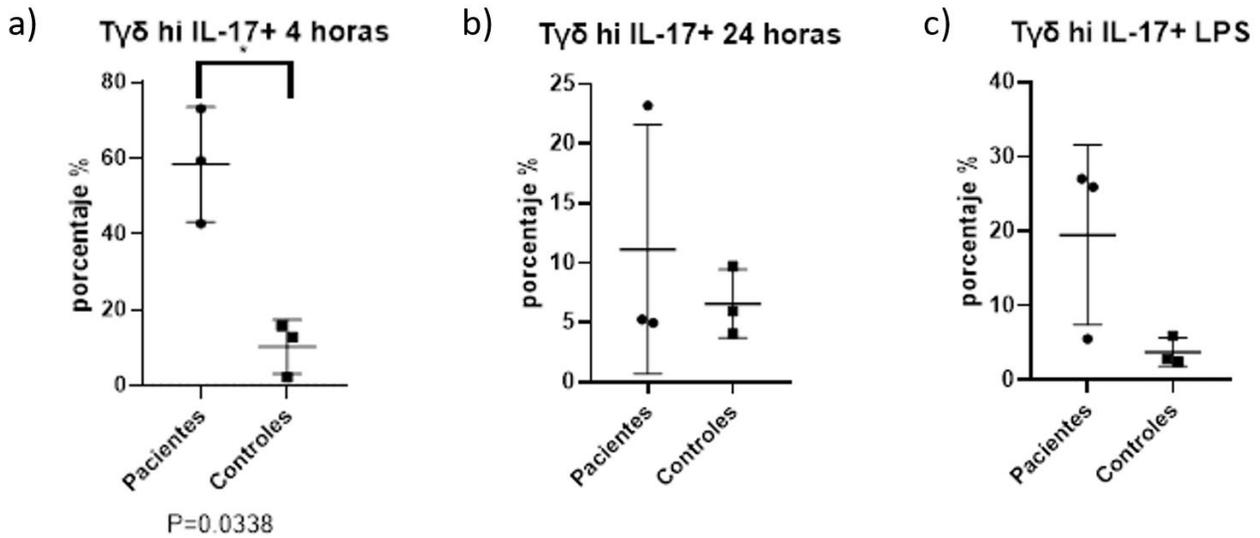
**Figura 12.** Intensidad media de fluorescencia de CD45RO+ y CD161+ en las células T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7+$  y T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7-$ , en pacientes. a) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra) de las T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7+$  vs T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7-$ , b) muestra incubada 24hrs/37°C, de las T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7+$  vs T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7-$ , c) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS) T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7+$  vs T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7-$  d) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra) de las T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7+$  vs T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7-$ , e) muestra incubada 24hrs/37°C, de las T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7+$  vs T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7-$ , f) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS) de las T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7+$  vs T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7-$ .

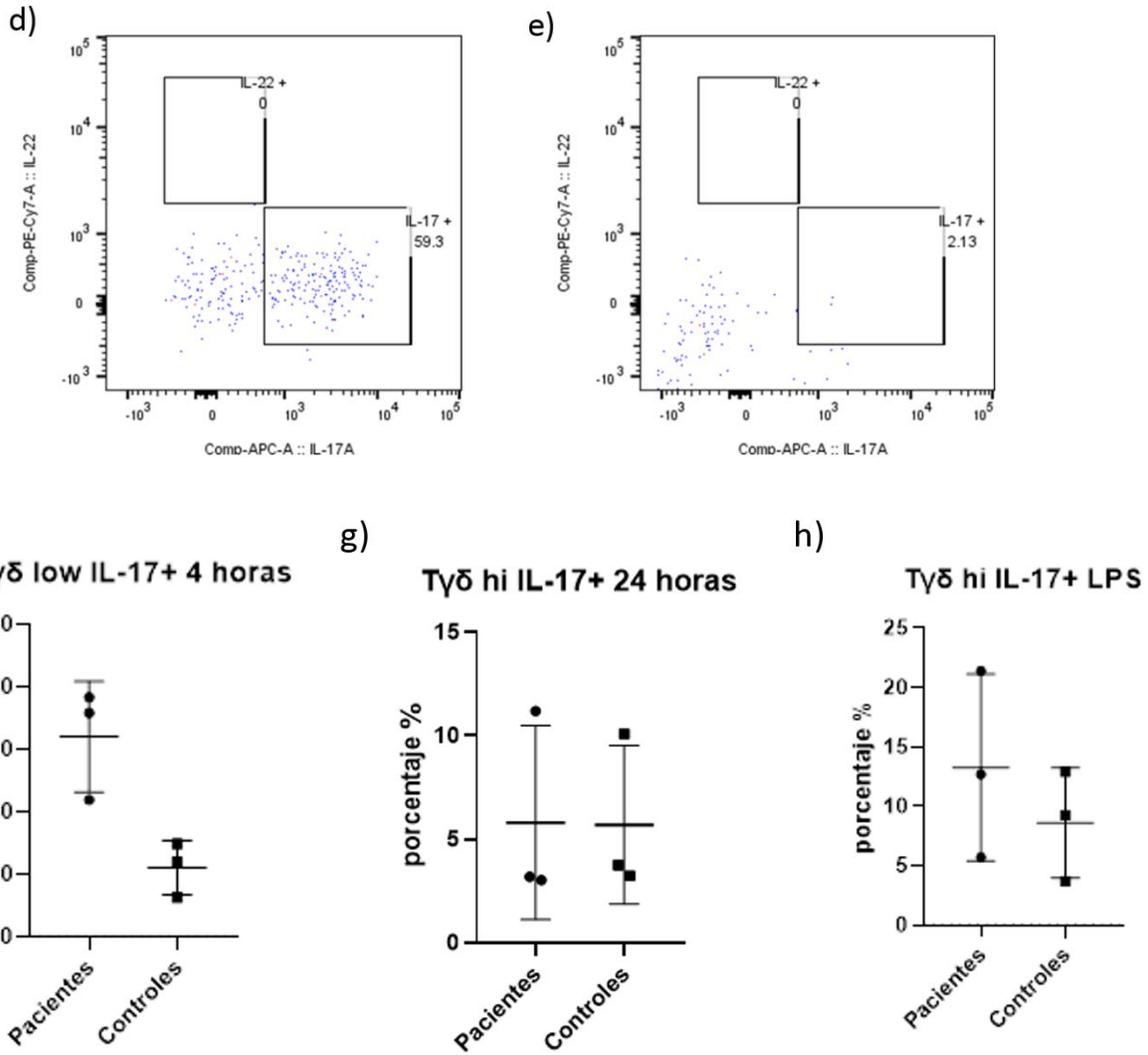
De las poblaciones de células T  $\gamma\delta$  totales, T $\gamma\delta$ <sup>hi</sup>, T $\gamma\delta$ <sup>low</sup>, y de las T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7+$ , T  $\gamma\delta$ CD27+, T  $\gamma\delta$  CD27-, T  $\gamma\delta$  CD161+, T  $\gamma\delta$  CD45RO+ se midió el porcentaje de aquellas productoras de IL-17. Se observó una sobreproducción de IL-17+ en las células T  $\gamma\delta$  totales de los pacientes (P=0.0205) en el tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (Figura 13a), al igual, el subconjunto T  $\gamma\delta$ <sup>hi</sup> mostró valores significativamente mayores en los pacientes (P=0.0338) en el tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (Figura 14 a). Además, para las células T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7+$ , se encontró una sobreproducción de IL-17+ en los pacientes (P=0.0128) (Figura 15 a) a diferencia de las poblaciones T  $\gamma\delta$  CD27+, T  $\gamma\delta$  CD27-, T  $\gamma\delta$  CD161+, T  $\gamma\delta$  CD45RO+ donde los valores no fueron estadísticamente significativos (Figuras 16 y 17).



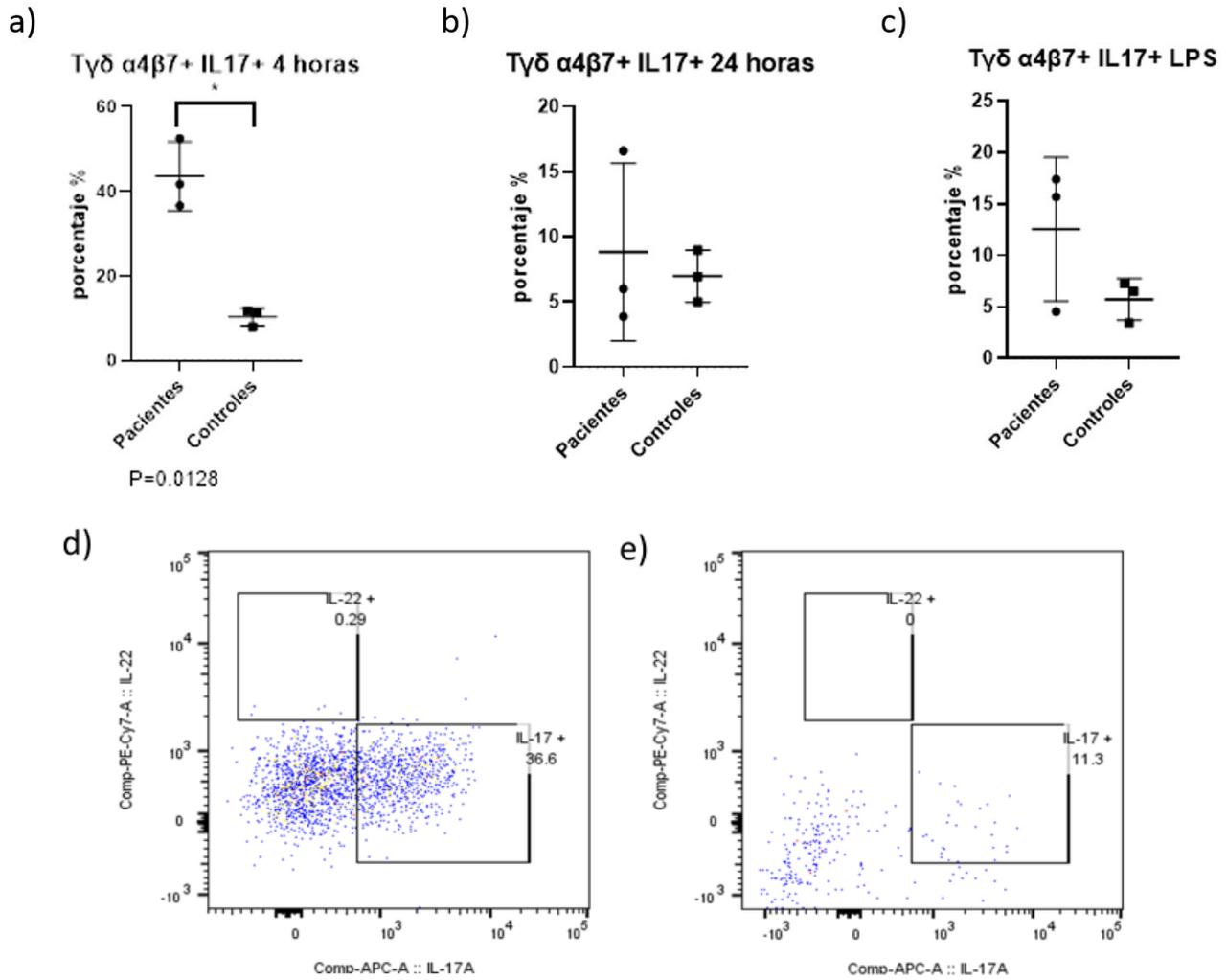


**Figura 13.** Porcentaje de células T  $\gamma\delta$  totales productoras de IL-17+ de pacientes comparados con controles (sujetos sanos). a) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra), b) muestra incubada 24hrs/37°C, c) LPS (muestra activada con 10000 ng de LPS). d) y e) Dot plots representativos que muestran los gates del porcentaje total de células T  $\gamma\delta$  totales productoras de IL-17+ d) pacientes y e) controles.

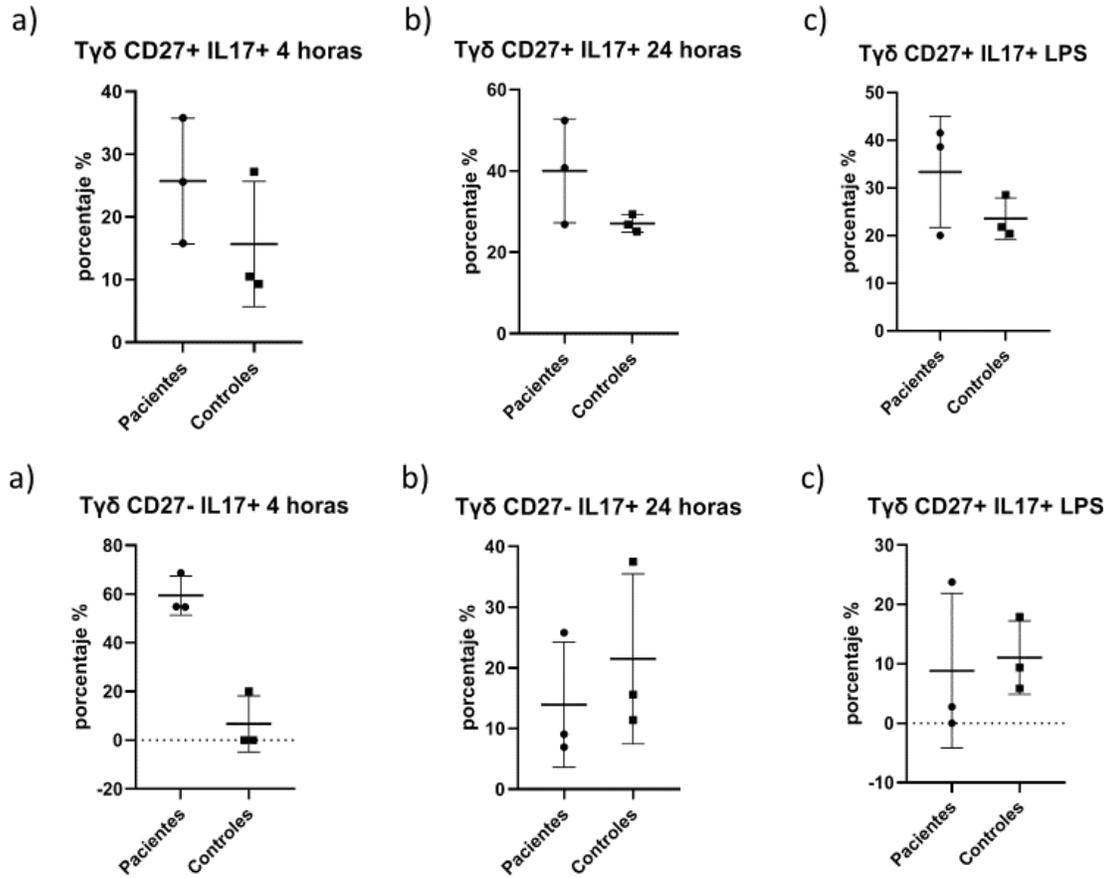




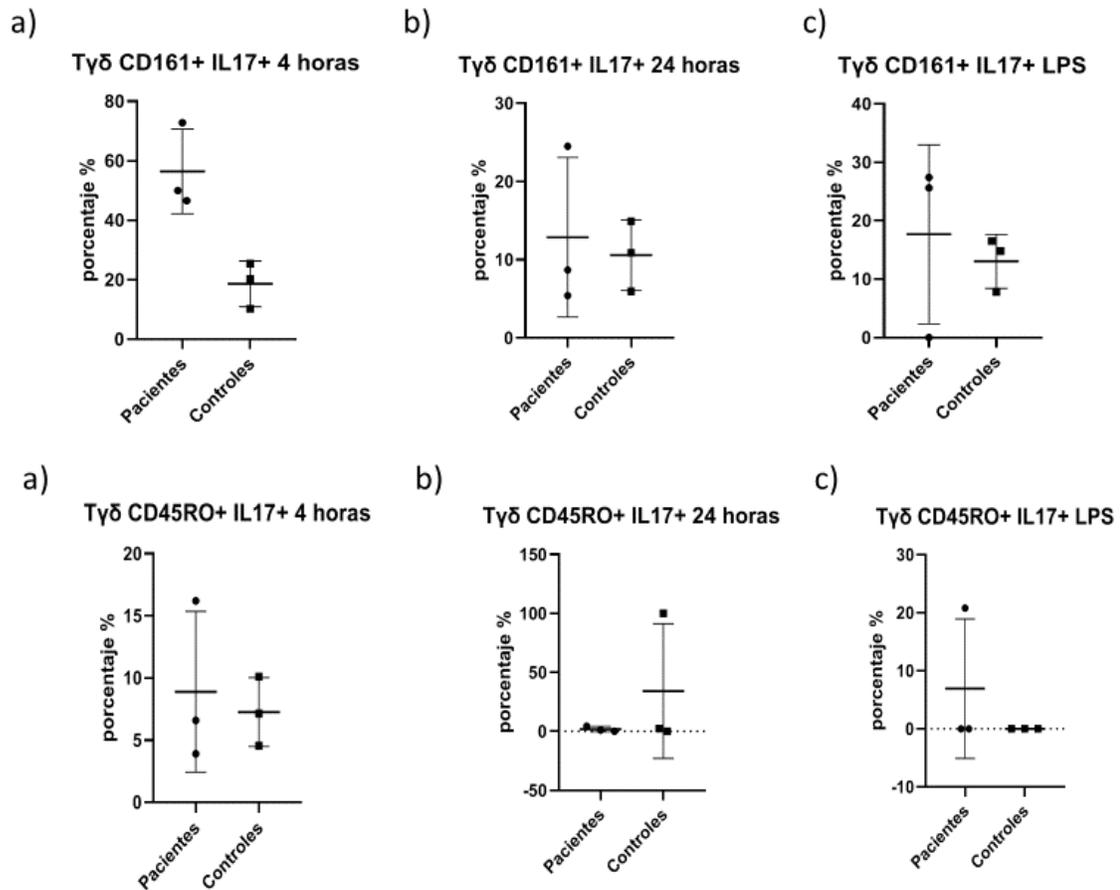
**Figura 14.** Porcentaje de los subconjuntos de células T  $\gamma\delta$  totales (T  $\gamma\delta$ <sup>hi</sup> y T  $\gamma\delta$ <sup>low</sup>) productoras de IL-17+ de pacientes comparados con controles (sujetos sanos). a) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra) de las T  $\gamma\delta$ <sup>hi</sup> IL-17+, b) muestra incubada 24hrs/37°C, de las T  $\gamma\delta$ <sup>hi</sup> IL-17+, c) LPS (muestra activada con 10000ngde LPS) de las T  $\gamma\delta$ <sup>hi</sup> IL-17+. d) y e) Dot plots representativos que muestran los gates del porcentaje total de células T  $\gamma\delta$ <sup>hi</sup> IL-17+ d) pacientes y e) controles. f) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra) de las T  $\gamma\delta$ <sup>low</sup> IL-17+, g) muestra incubada 24hrs/37°C, de las T  $\gamma\delta$ <sup>low</sup> IL-17+, h) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS) de las T  $\gamma\delta$ <sup>low</sup> IL-17+.



**Figura 15.** Porcentaje de células T  $\gamma\delta$  totales, y a su vez, positivas a la integrina  $\alpha4\beta7+$  productoras de IL-17+, de pacientes comparados con controles (sujetos sanos). a) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra), b) muestra incubada 24hrs/37°C, c) LPS (muestra activada con 10000 ng de LPS). d) y e) Dot plots representativos que muestran los gates del porcentaje total de células T  $\gamma\delta$  totales  $\alpha4\beta7+$  productoras de IL-17+ d) pacientes y e) controles.



**Figura 16.** Porcentaje de las células T  $\gamma\delta$  totales CD27+ positivas y CD27- negativas productoras de IL-17+, pacientes comparados con controles (sujetos sanos). a) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra) de las T  $\gamma\delta$  CD27+ IL-17+, b) muestra incubada 24hrs/37°C) de las T  $\gamma\delta$  CD27+ IL-17+, c) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS) T  $\gamma\delta$  CD27+ IL-17+. d) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra) de las T CD27- IL-17+, e) muestra incubada 24hrs/37°C, de las T CD27- IL-17+, f) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS) de las T CD27- IL-17+.



**Figura 17.** Porcentaje de las células T  $\gamma\delta$  totales CD45RO+ positivas y, T  $\gamma\delta$  totales CD161+ positivas, productoras de IL-17+ de pacientes comparados con controles (sujetos sanos). a) ) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra) de las T  $\gamma\delta$  totales CD45RO+ IL-17+ b) muestra incubada 24hrs/37°C, de las T  $\gamma\delta$  totales CD45RO+ IL-17+, c) LPS (muestra activada con 10000ng de LPS) T  $\gamma\delta$  totales CD45RO+ IL-17+ ,d) ) tubo teñido a las 4 hrs después de la toma de muestra (teñida el día de obtención de la muestra) de las CD161+ IL-17+, e) muestra incubada 24hrs/37°C, de las CD161+ IL-17+, f) LPS ( muestra activada con 10000ng de LPS) CD161+ IL-17+.

## Discusión

En este trabajo se analizaron muestras de pacientes con SpA por medio de citometría espectral de poblaciones de células T  $\gamma\delta$  y su caracterización a través de marcadores de memoria inmune innata como CD27, CD45RO y CD161. Así mismo se buscó la presencia de la integrina  $\alpha 4\beta 7$  en las poblaciones de células T  $\gamma\delta$ , ya que se ha descrito como un receptor de activación intestinal (Keir *et al.*, 2021; Romero-López *et al.*, 2020), y su relación con las poblaciones de células T  $\gamma\delta$  que muestran características con la memoria inmune innata.

En los resultados, se encontró que los porcentajes de células T  $\gamma\delta$  totales en sangre periférica de los pacientes se encuentran aumentados ( $P=0.0173$ ) (Figura 4b.), similar a lo reportado para una cohorte de pacientes que presentaban artritis juvenil relacionada con entesitis (Gaur *et al.*, 2015), lo que puede indicar un posible incremento de las células T  $\gamma\delta$  en sangre periférica de sujetos que atraviesan una respuesta inmunológica sistémica activa, en este caso, condiciones inflamatorias características de los pacientes con SpA y artritis juvenil relacionada con entesitis.

Además, se identificó al subconjunto de las células T  $\gamma\delta$  de menor expresión “low” aumentado en los pacientes ( $P=0.0228$ ) (Figura 5b.), respecto a los controles, donde el comportamiento de esta población no ha sido claro en enfermedades inflamatorias.

Los porcentajes de células T  $\gamma\delta$  totales y sus subconjuntos de mayor y menor expresión,  $^{hi}$  y  $^{low}$  respectivamente, positivos a la integrina  $\alpha 4\beta 7$  de los pacientes, no presentaron diferencias significativas en ninguno de los tubos teñidos, sin embargo, están presentes, a diferencia de los controles donde sus porcentajes son cercanos al 0%. Esto concuerda con múltiples investigaciones en SpA que reportan que las células T  $\gamma\delta$  pueden ser reconocidas como una población disponible que migra a sitios de inflamación, y así ser identificada con el receptor para la integrina  $\alpha 4\beta 7$  (Dieli *et al.*, 2003a; Romero-López *et al.*, 2020).

Se observa que la población de células T  $\gamma\delta$  totales positivos a CD27 esta disminuida en los pacientes, a diferencia de los controles donde se encontró significativa ( $P=0.0070$ ) (Figura 7a.), y esto concuerda con datos obtenidos en

estudios donde identifican células T  $\gamma\delta$  vírgenes de pacientes sanos, a través del correceptor CD27+ (deBarros *et al.*, 2011), contrario a esto, se observaron aumentadas las células T  $\gamma\delta$  totales negativas a CD27 ( $P=0.0063$ ) (Figura 7f.), lo que sugiere una inclinación hacia el fenotipo CD27- en los pacientes con SpA, las cuales se han conocido como células T  $\gamma\delta$  de memoria efectora (Dieli *et al.*, 2003b). Por otra parte, la población de células T  $\gamma\delta$  totales positivas a CD45RO y T  $\gamma\delta$  totales positivos a CD161 no se observaron diferencias significativas (Figura 8).

En este sentido se midió el porcentaje de los T  $\gamma\delta$  totales positivos a CD27, CD45RO, CD161 y T  $\gamma\delta$  negativos a CD27, con relación a su positividad a la integrina  $\alpha 4\beta 7$ , observando una disminución de las células T  $\gamma\delta$  totales positivos a CD27 y positivos a  $\alpha 4\beta 7$  en los pacientes a diferencia de los controles ( $P=0.0142$ ) (Figura 9a.), contrario a esto, se observa un incremento de las células T  $\gamma\delta$  totales negativas a CD27 y positivas a  $\alpha 4\beta 7$  ( $P=0.0187$ ) (Figura 9f.) en pacientes. Como se ha observado que el fenotipo CD27- está relacionado con la producción de IL-17, con estos resultados se sugiere que las células T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7+$  pueden ser activadas en órganos linfoides asociados al intestino y encontrarse en circulación dirigidos a zonas de inflamación, en este caso, al intestino o articulación, y así cumplir su función efectora particular de las SpA (Chowdhury *et al.*, 2017; Kessel *et al.*, 2017). Como se ha demostrado, que el ligando principal de la integrina  $\alpha 4\beta 7$ , MAdCAM1, está sobre expresado en el intestino y la médula ósea inflamada de pacientes con SpA (Ciccia *et al.*, 2015), y se ha reconocido con el eje intestino-articulación su capacidad de recircular desde el intestino hasta sitios de inflamación, a través de células con capacidad productora de IL-17 e IL-22, como las células T  $\gamma\delta$ . En este sentido, se ha identificado un aumento de esta población (T  $\gamma\delta$ ) con sobreproducción de IL-17 en sangre y líquido sinovial de pacientes con SpA (Chowdhury *et al.*, 2017; Kessel *et al.*, 2017; Romero-López *et al.*, 2020).

En relación con las células T  $\gamma\delta$  totales  $\alpha 4\beta 7$  positivas a CD45RO y a CD161 no mostraron diferencias significativas en ninguno de los 3 tubos teñidos (Figura 10), aún no se ha descrito con claridad el papel de estos marcadores y su relación con la integrina  $\alpha 4\beta 7$ .

Respecto a los resultados de intensidad media de fluorescencia (IMF) para la expresión de CD27, CD161 y CD45RO para las células T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7+$  y T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7-$  de sangre total de pacientes, se observó a la población T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7+$  con una expresión significativa para CD27 (P=0.0319) (Figura 11b). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de CD45RO y CD161 en las demás poblaciones T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7+$  ni en las T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7-$ , en ninguno de los 3 tubos (Figura 12).

Finalmente, en los resultados observados en el análisis de la población de células T  $\gamma\delta$  totales, T  $\gamma\delta$  <sup>hi</sup>, T  $\gamma\delta$  <sup>low</sup>, T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7+$ , T  $\gamma\delta$  CD27-, T  $\gamma\delta$  CD27+, T  $\gamma\delta$  CD45RO, T  $\gamma\delta$  CD161+ y su producción de la citocina IL-17, se observó un incremento en las células T  $\gamma\delta$  totales productoras de IL-17 en los pacientes (P=0.0205) (Figura 13 a), debido a que esta población celular se ha observado que es un productor importante de IL-17 en el intestino y tejidos periféricos, puede conducir a un desequilibrio de la IL-17 característico en SpA (Berlinberg & Kuhn, 2020). Del mismo modo, el subconjunto de células T  $\gamma\delta$  <sup>hi</sup> se encontró incrementado en los pacientes (P=0.0338) (Figura 14 a) contrariamente a las células T  $\gamma\delta$  <sup>low</sup>, estos subconjuntos no han sido estudiados ampliamente, pero se ha visto que se comportan de manera distinta al expresar distintos marcadores de superficie en enfermedades inflamatorias como las SpA (Odaira *et al.*, 2016).

De las poblaciones positivas T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7+$ , T  $\gamma\delta$  CD27+, T  $\gamma\delta$  CD45RO, T  $\gamma\delta$  CD161+ y negativas T  $\gamma\delta$  CD27-, productoras de la citocina IL-17, solo se observaron diferencias significativas en la población T  $\gamma\delta$  positivas a la integrina  $\alpha 4\beta 7$  (P=0.0128) (Figura 15 a), y gracias a esto podemos reforzar la relación que se tiene entre la población de células T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7+$  productoras de IL-17 en la patogénesis de las SpA (Del Vescovo *et al.*, 2023). Nos permite conocer y proporcionar otro antecedente más a las pruebas acerca de que las células T  $\gamma\delta$   $\alpha 4\beta 7+$  productoras de IL-17 pueden estar directamente involucradas en la inflamación en las SpA.

La expresión de CD27 se ha utilizado en múltiples estudios para caracterizar células T  $\gamma\delta$  productoras de INF- $\gamma$  (CD27+) o IL-17 (CD27-), así como su capacidad de proliferar en tejidos inflamados (CD27-)(Ribot *et al.*, 2009), por lo que este marcador es de suma importancia en la identificación de la producción de IL-17 en pacientes con SpA.

Por otra parte, con observaciones sobre las isoformas del marcador CD45 se ha identificado a CD45RO como la isoforma de memoria, impulsada por estimulación antigénica y existen pocos estudios donde se implican a las células T  $\gamma\delta$ , (Comeau *et al.*, 2020; Odaira *et al.*, 2016), estos antecedentes son importantes para conocer concretamente el papel de las células T  $\gamma\delta$  en la destrucción de células que han sido infectadas por virus y contra infecciones bacterianas (Bernal-Alferes *et al.*, 2023) mediando respuestas inmunitarias a través de la producción de IL-17 A, citocina fuertemente implicada en la patogénesis de las SpA.

Además, la expresión de CD161 identificada en la población T  $\gamma\delta$  productoras de IL-17, se puede asociar con la sobreexpresión que tiene este marcador en células NK, T  $\gamma\delta$ , y células MAIT (Karunathilaka *et al.*, 2022). En este sentido, CD161 se ha asociado fuertemente con las células T  $\gamma\delta$  y su aumento en la producción de IL-17 (Fergusson *et al.*, 2014; Maggi *et al.*, 2010).

Con estudios donde observan estos marcadores en diversas enfermedades inflamatorias se ha definido al fenotipo CD27- CD45RO- como característico de memoria efectora en células T  $\gamma\delta$  (Odaira *et al.*, 2016), lo que nos puede reafirmar la idea de su reactivación secundaria, la cual no se ha consolidado completamente. Asimismo, CD161 se ha establecido como un marcador de células innatas con una capacidad efectora mejorada para responder a un segundo estímulo (Karunathilaka *et al.*, 2022).

Aún no se ha consolidado el estudio en humanos sobre la posibilidad de que las células T  $\gamma\delta$  puedan responder a un evento secundario, sin embargo, se han realizado este tipo estudios, se puede tener más acercamientos al hecho de que las células T  $\gamma\delta$  tengan memoria y puedan contribuir en respuestas primarias y de reactivación ante infecciones bacterianas.

## **Conclusiones**

- Existe una mayor frecuencia de células  $T\gamma\delta$  en pacientes con SpA a diferencia de los controles.
- Las células  $T\gamma\delta$  de los pacientes con SpA son en su mayoría negativas al marcador CD27.
- Las células  $T\gamma\delta$  CD27- son mayormente positivas a la integrina  $\alpha4\beta7$ .
- La frecuencia de células  $T\gamma\delta$  totales productoras de IL-17 es mayor en pacientes con SpA a diferencia de los controles sanos.

## **Perspectivas**

El incremento de muestras de pacientes con SpA nos permitiría realizar un seguimiento de las células  $T\gamma\delta$  en las SpA, y así identificar con claridad su expresión de distintos marcadores de memoria.

## Referencias

- AC, K., RN, M., GC, N., GD, P., GL, R., & JT, S. (1978). Role of Chlamydia trachomatis and HLA-B27 in sexually acquired reactive arthritis. *British Medical Journal*, 1(6113), 605–607. <https://doi.org/10.1136/BMJ.1.6113.605>
- Berlinberg, A., & Kuhn, K. A. (2020). Barrier lymphocytes in spondyloarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, 32(4), 343. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000716>
- Bernal-Alferes, B., Basilio-Aguilar, J., Domínguez-López, L., Romero-López, P., & Romero-López, J. P. (2021). Papel del eje intestino-piel-articulación en enfermedades inmunomediadas. Papel de nuevas terapias con JAKinibs selectivos e inhibidores IL23p19. *Revista Mexicana de Enfermedades Inflamatorias Inmunomediadas*, 1(3). <https://doi.org/10.24875/IMIDS.M21000012>
- Bernal-Alferes, B., Gómez-Mosqueira, R., Ortega-Tapia, G. T., Burgos-Vargas, R., García-Latorre, E., Domínguez-López, M. L., & Romero-López, J. P. (2023). The role of  $\gamma\delta$  T cells in the immunopathogenesis of inflammatory diseases: From basic biology to therapeutic targeting. *Journal of Leukocyte Biology*. <https://doi.org/10.1093/JLEUKO/QIAD046>
- Bowness, P. (2015). HLA-B27. *Annual Review of Immunology*, 33, 29–48. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032414-112110>
- Brakenhoff, L. K. P. M., van der Heijde, D. M., Hommes, D. W., Huizinga, T. W. J., & Fidler, H. H. (2010). The joint—gut axis in inflammatory bowel diseases. *Journal of Crohn's and Colitis*, 4(3), 257–268. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2009.11.005>
- Breban, M., Beaufrère, M., & Glatigny, S. (2019). The microbiome in spondyloarthritis. *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology*, 33(6). <https://doi.org/10.1016/J.BERH.2020.101495>
- C Abraham, J. C. (2009). Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 361 ( 21 ), págs . 2066-2078.
- Carman, C. V., & Springer, T. A. (2003). Integrin avidity regulation: Are changes in affinity and conformation underemphasized? *Current Opinion in Cell Biology*, 15(5), 547–556. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.08.003>
- Chen, W. S., Chang, Y. S., Lin, K. C., Lai, C. C., Wang, S. H., Hsiao, K. H., Lee, H. T., Chen, M. H., Tsai, C. Y., & Chou, C. T. (2012). Association of serum interleukin-17 and interleukin-23 levels with disease activity in Chinese patients with ankylosing spondylitis. *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA*, 75(7), 303–308. <https://doi.org/10.1016/J.JCMA.2012.05.006>

- Cho, J. H. (2008). The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology* 2008 8:6, 8(6), 458–466. <https://doi.org/10.1038/nri2340>
- Chowdhury, A. C., Chaurasia, S., Mishra, S. K., Aggarwal, A., & Misra, R. (2017). IL-17 and IFN- $\gamma$  producing NK and  $\gamma\delta$ -T cells are preferentially expanded in synovial fluid of patients with reactive arthritis and undifferentiated spondyloarthritis. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 183, 207–212. <https://doi.org/10.1016/J.CLIM.2017.03.016>
- Ciccia, F., Guggino, G., Rizzo, A., Saieva, L., Peralta, S., Giardina, A., Cannizzaro, A., Sireci, G., De Leo, G., Alessandro, R., & Triolo, G. (2015). Type 3 innate lymphoid cells producing IL-17 and IL-22 are expanded in the gut, in the peripheral blood, synovial fluid and bone marrow of patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74(9), 1739–1747. <https://doi.org/10.1136/ANNRHEUMDIS-2014-206323>
- Comeau, K., Paradis, P., & Schiffrin, E. L. (2020). Human and murine memory  $\gamma\delta$  T cells: Evidence for acquired immune memory in bacterial and viral infections and autoimmunity. *Cellular Immunology*, 357, 104217. <https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2020.104217>
- Cortes, A., Hadler, J., Pointon, J. P., Robinson, P. C., Karaderi, T., Leo, P., Cremin, K., Pryce, K., Harris, J., Lee, S., Joo, K. Bin, Shim, S. C., Weisman, M., Ward, M., Zhou, X., Garchon, H. J., Chiochia, G., Nossent, J., Lie, B. A., ... Brown, M. A. (2013). Identification of multiple risk variants for ankylosing spondylitis through high-density genotyping of immune-related loci. *Nature Genetics*, 45(7), 730–738. <https://doi.org/10.1038/NG.2667>
- De Winter, J. J., Paramarta, J. E., De Jong, H. M., Van De Sande, M. G., & Baeten, D. L. (2019). Peripheral disease contributes significantly to the level of disease activity in axial spondyloarthritis. *RMD Open*, 5(1). <https://doi.org/10.1136/RMDOPEN-2018-000802>
- de Winter, J. J., van Mens, L. J., van der Heijde, D., Landewé, R., & Baeten, D. L. (2016). Prevalence of peripheral and extra-articular disease in ankylosing spondylitis versus non-radiographic axial spondyloarthritis: a meta-analysis. *Arthritis Research & Therapy*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S13075-016-1093-Z>
- deBarros, A., Chaves-Ferreira, M., D'Orey, F., Ribot, J. C., & Silva-Santos, B. (2011). CD70–CD27 interactions provide survival and proliferative signals that regulate T cell receptor-driven activation of human  $\gamma\delta$  peripheral blood lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 41(1), 195–201. <https://doi.org/10.1002/EJI.201040905>

- Del Vescovo, S., Venerito, V., Iannone, C., & Lopalco, G. (2023). Uncovering the Underworld of Axial Spondyloarthritis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7). <https://doi.org/10.3390/IJMS24076463>
- Dieli, F., Poccia, F., Lipp, M., Sireci, G., Caccamo, N., Di Sano, C., & Salerno, A. (2003a). Differentiation of Effector/Memory V $\delta$ 2 T Cells and Migratory Routes in Lymph Nodes or Inflammatory Sites. *Journal of Experimental Medicine*, 198(3), 391–397. <https://doi.org/10.1084/JEM.20030235>
- Dieli, F., Poccia, F., Lipp, M., Sireci, G., Caccamo, N., Di Sano, C., & Salerno, A. (2003b). Differentiation of Effector/Memory V $\delta$ 2 T Cells and Migratory Routes in Lymph Nodes or Inflammatory Sites. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(3), 391. <https://doi.org/10.1084/JEM.20030235>
- Divangahi, M., Aaby, P., Khader, S. A., Barreiro, L. B., Bekkering, S., Chavakis, T., van Crevel, R., Curtis, N., DiNardo, A. R., Dominguez-Andres, J., Duivenwoorden, R., Fanucchi, S., Fayad, Z., Fuchs, E., Hamon, M., Jeffrey, K. L., Khan, N., Joosten, L. A. B., Kaufmann, E., ... Netea, M. G. (2021). Trained immunity, tolerance, priming and differentiation: distinct immunological processes. *Nature Immunology*, 22(1), 2. <https://doi.org/10.1038/S41590-020-00845-6>
- Do, J., Kim, S., Keslar, K., Jang, E., Huang, E., Fairchild, R. L., Pizarro, T. T., & Min, B. (2017).  $\gamma\delta$  T Cells Coexpressing Gut Homing  $\alpha 4\beta 7$  and  $\alpha E$  Integrins Define a Novel Subset Promoting Intestinal Inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 198(2), 908–915. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1601060>
- Dougados, M., & Baeten, D. (2011). Spondyloarthritis. *Lancet (London, England)*, 377(9783), 2127–2137. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60071-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60071-8)
- Evans, D. M., Spencer, C. C. A., Pointon, J. J., Su, Z., Harvey, D., Kochan, G., Opperman, U., Dilthey, A., Pirinen, M., Stone, M. A., Appleton, L., Moutsianis, L., Leslie, S., Wordsworth, T., Kenna, T. J., Karaderi, T., Thomas, G. P., Ward, M. M., Weisman, M. H., ... Donnelly, P. (2011). Interaction between ERAP1 and HLA-B27 in ankylosing spondylitis implicates peptide handling in the mechanism for HLA-B27 in disease susceptibility. *Nature Genetics*, 43(8), 761–767. <https://doi.org/10.1038/NG.873>
- Fergusson, J. R., Smith, K. E., Fleming, V. M., Rajoriya, N., Newell, E. W., Simmons, R., Marchi, E., Björkander, S., Kang, Y. H., Swadling, L., Kurioka, A., Sahgal, N., Lockstone, H., Baban, D., Freeman, G. J., Sverremark-Ekström, E., Davis, M. M., Davenport, M. P., Venturi, V., ... Klenerman, P. (2014). CD161 defines a transcriptional and functional phenotype across distinct human T cell lineages. *Cell Reports*, 9(3), 1075–1088. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2014.09.045>

- Gaston, J. S. H., & Jadon, D. R. (2017). Th17 cell responses in spondyloarthritis. *Best Practice & Research. Clinical Rheumatology*, 31(6), 777–796. <https://doi.org/10.1016/J.BERH.2018.07.010>
- Gaur, P., Misra, R., & Aggarwal, A. (2015). Natural killer cell and gamma delta T cell alterations in enthesitis related arthritis category of juvenile idiopathic arthritis. *Clinical Immunology*, 161(2), 163–169. <https://doi.org/10.1016/J.CLIM.2015.07.012>
- Giacomelli, R., Parzanese, I., Frieri, G., Passacantando, A., Pizzuto, F., Pimpo, T., Cipriani, P., Viscido, A., Caprilli, R., & Tonietti, G. (1994). Increase of circulating gamma/delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients affected by active inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 98(1), 83–88. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2249.1994.TB06611.X>
- Gill, T., & Rosenbaum, J. T. (2021). Putative Pathobionts in HLA-B27-Associated Spondyloarthropathy. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.586494>
- Gioia, C., Agrati, C., Casetti, R., Cairo, C., Borsellino, G., Battistini, L., Mancino, G., Goletti, D., Colizzi, V., Pucillo, L. P., & Poccia, F. (2002). Lack of CD27–CD45RA–V $\gamma$ 9V $\delta$ 2+ T Cell Effectors in Immunocompromised Hosts and During Active Pulmonary Tuberculosis. *The Journal of Immunology*, 168(3), 1484–1489. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.168.3.1484>
- Granfors, K., Jalkanen, S., Mäki-Ikola, O., Lahesmaa-Rantala, R., Saario, R., Toivanen, A., Lindberg, A. A., von Essen, R., Isomaki, H., & Arnold, W. J. (1990). Salmonella lipopolysaccharide in synovial cells from patients with reactive arthritis. *Lancet (London, England)*, 335(8691), 685–688. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)90804-E](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)90804-E)
- Guerra-Maupome, M., Palmer, M. V., Waters, W. R., & McGill, J. L. (2019). Characterization of  $\gamma\delta$  T cell effector/memory subsets based on CD27 and CD45R expression in response to Mycobacterium bovis infection. *ImmunoHorizons*, 3(6), 208. <https://doi.org/10.4049/IMMUNOHORIZONS.1900032>
- Haller-Schober, E. M., & El-Shabrawi, Y. (2002). Chlamydial conjunctivitis (in adults), uveitis, and reactive arthritis, including SARA. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 16(6), 815–828. <https://doi.org/10.1053/beog.2002.0320>
- Hoft, D. F., Brown, R. M., & Roodman, S. T. (1998). Bacille Calmette-Guérin vaccination enhances human gamma delta T cell responsiveness to mycobacteria suggestive of a memory-like phenotype. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(2), 1045–1054.

- Karunathilaka, A., Halstrom, S., Price, P., Holt, M., Lutzky, V. P., Doolan, D. L., Kupz, A., Bell, S. C., Thomson, R. M., Miles, J. J., & Ratnatunga, C. N. (2022). CD161 expression defines new human  $\gamma\delta$  T cell subsets. *Immunity and Ageing*, *19*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12979-022-00269-W/TABLES/1>
- Kazen, A. R., & Adams, E. J. (2011). Evolution of the V, D, and J gene segments used in the primate  $\gamma\delta$  T-cell receptor reveals a dichotomy of conservation and diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(29), E332. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1105105108/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Keat, A. C., Maini, R. N., Nkwazi, G. C., Pegrum, G. D., Ridgway, G. L., & Scott, J. T. (1978). Role of Chlamydia trachomatis and HLA-B27 in sexually acquired reactive arthritis. *British Medical Journal*, *1*(6113), 605. <https://doi.org/10.1136/BMJ.1.6113.605>
- Kempster, S. L., & Kaser, A. (2014).  $\alpha 4\beta 7$  integrin: beyond T cell trafficking. *Gut*, *63*(9), 1377–1379. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2013-305967>
- Kenna, T. J., Davidson, S. I., Duan, R., Bradbury, L. A., McFarlane, J., Smith, M., Weedon, H., Street, S., Thomas, R., Thomas, G. P., & Brown, M. A. (2012). Enrichment of circulating interleukin-17-secreting interleukin-23 receptor-positive  $\gamma/\delta$  T cells in patients with active ankylosing spondylitis. *Arthritis and Rheumatism*, *64*(5), 1420–1429. <https://doi.org/10.1002/ART.33507>
- Kessel, C., Lippitz, K., Weinlage, T., Hinze, C., Wittkowski, H., Holzinger, D., Fall, N., Grom, A. A., Gruen, N., & Foell, D. (2017). Proinflammatory Cytokine Environments Can Drive Interleukin-17 Overexpression by  $\gamma/\delta$  T Cells in Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, *69*(7), 1480–1494. <https://doi.org/10.1002/ART.40099>
- Kiwalkar, S., Rosenbaum, J. T., Schwartzman, S., Dutz, J. P., & Van Den Bosch, F. (2019). Extraarticular Manifestations: Uveitis, Colitis, Psoriasis. *Axial Spondyloarthritis*, 157–182. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-56800-5.00011-4>
- Lauvau, G., & Soudja, S. M. (2015). Mechanisms of memory T Cell activation and effective immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *850*, 73–80. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-15774-0\\_6/FIGURES/1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-15774-0_6/FIGURES/1)
- Longman, R. S., Diehl, G. E., Victorio, D. A., Huh, J. R., Galan, C., Miraldi, E. R., Swaminath, A., Bonneau, R., Scherl, E. J., & Littman, D. R. (2014). CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> mononuclear phagocytes support colitis-associated innate lymphoid cell production of IL-22. *The Journal of Experimental Medicine*, *211*(8), 1571–1583. <https://doi.org/10.1084/JEM.20140678>

- López-Medina, C., Molto, A., Sieper, J., Duruöz, T., Kiltz, U., Elzorkany, B., Hajjaj-Hassouni, N., Burgos-Vargas, R., Maldonado-Cocco, J., Ziade, N., Gavali, M., Navarro-Compan, V., Luo, S.-F., Monti, S., Tae-Jong, K., Kishimoto, M., Pimentel-Santos, F. M., Gu, J., Schiotis, R., ... Dougados, M. (2021). Prevalence and distribution of peripheral musculoskeletal manifestations in spondyloarthritis including psoriatic arthritis: results of the worldwide, cross-sectional ASAS-PerSpA study. *RMD Open*, 7(1), e001450. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2020-001450>
- Maggi, L., Santarasci, V., Capone, M., Peired, A., Frosali, F., Crome, S. Q., Querci, V., Fambrini, M., Liotta, F., Levings, M. K., Maggi, E., Cosmi, L., Romagnani, S., & Annunziato, F. (2010). CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *European Journal of Immunology*, 40(8), 2174–2181. <https://doi.org/10.1002/EJI.200940257>
- Martínez, A., Pacheco-Tena, C., Vázquez-Mellado, J., & Burgos-Vargas, R. (2004). Relationship between disease activity and infection in patients with spondyloarthropathies. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 63(10), 1338–1340. <https://doi.org/10.1136/ARD.2003.011882>
- Martínez-gonzález, O., Cantero-hinojosa, J., Paule-sastre, P., Gómez-magán, J. C., & Salvatierra-ríos, D. (1994). Intestinal permeability in patients with ankylosing spondylitis and their healthy relatives. *British Journal of Rheumatology*, 33(7), 644–647. <https://doi.org/10.1093/RHEUMATOLOGY/33.7.644>
- Mohammadi, H., Hemmatzadeh, M., Babaie, F., Gowhari Shabgah, A., Azizi, G., Hosseini, F., Majidi, J., & Baradaran, B. (2018). MicroRNA implications in the etiopathogenesis of ankylosing spondylitis. *Journal of Cellular Physiology*, 233(8), 5564–5573. <https://doi.org/10.1002/JCP.26500>
- Ness-Schwickerath, K. J., Jin, C., & Morita, C. T. (2010). Cytokine Requirements for the Differentiation and Expansion of IL-17A- and IL-22-producing Human V $\gamma$ 2V $\delta$ 2 T Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(12), 7268. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1000600>
- Netea, M. G. (2013). Training innate immunity: the changing concept of immunological memory in innate host defence. *European Journal of Clinical Investigation*, 43(8), 881–884. <https://doi.org/10.1111/EJC.12132>
- Netea, M. G., Joosten, L. A. B., Latz, E., Mills, K. H. G., Natoli, G., Stunnenberg, H. G., O'Neill, L. A. J., & Xavier, R. J. (2016). Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science (New York, N. Y.)*, 352(6284), aaf1098. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAF1098>

- Netea, M. G., Quintin, J., & Van Der Meer, J. W. M. (2011). Trained immunity: A memory for innate host defense. *Cell Host and Microbe*, 9(5), 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006>
- Odaira, K., Kimura, S. N., Fujieda, N., Kobayashi, Y., Kambara, K., Takahashi, T., Izumi, T., Matsushita, H., & Kakimi, K. (2016). CD27(-)CD45(+)  $\gamma\delta$  T cells can be divided into two populations, CD27(-)CD45(int) and CD27(-)CD45(hi) with little proliferation potential. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(3), 1298–1303. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2016.08.115>
- Overview of the clinical manifestations and classification of spondyloarthritis - *UpToDate*. (n.d.). Retrieved August 28, 2023, from [https://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-clinical-manifestations-and-classification-of-spondyloarthritis?search=spondyloarthritis&source=search\\_result&selectedTitle=1](https://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-clinical-manifestations-and-classification-of-spondyloarthritis?search=spondyloarthritis&source=search_result&selectedTitle=1)
- Pacheco-Tena, C., Alvarado De La Barrera, C., López-Vidal, Y., Vázquez-Mellado, J., Richaud-Patin, Y., Amieva, R. I., Llorente, L., Martínez, A., Zúñiga, J., Cifuentes-Alvarado, M., & Burgos-Vargas, R. (2001). Bacterial DNA in synovial fluid cells of patients with juvenile onset spondyloarthropathies. *Rheumatology (Oxford, England)*, 40(8), 920–927. <https://doi.org/10.1093/RHEUMATOLOGY/40.8.920>
- Peláez-Ballestas, I., Navarro-Zarza, J. E., Julian, B., Lopez, A., Flores-Camacho, R., Casasola-Vargas, J. C., Sanin, L. H., Rivas, L., Vázquez-Mellado, J., & Burgos-Vargas, R. (2013). A community-based study on the prevalence of spondyloarthritis and inflammatory back pain in Mexicans. *Journal of Clinical Rheumatology : Practical Reports on Rheumatic & Musculoskeletal Diseases*, 19(2), 57–61. <https://doi.org/10.1097/RHU.0B013E3182862E65>
- Peláez-Ballestas, I., Sanin, L. H., Moreno-Montoya, J., Alvarez-Nemegyei, J., Burgos-Vargas, R., Garza-Elizondo, M., Rodríguez-Amado, J., Goycochea-Robles, M. V., Madariaga, M., Zamudio, J., Santana, N., & Cardiel, M. H. (2011). Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *Journal of Rheumatology*, 38(SUPPL. 86), 3–6. <https://doi.org/10.3899/jrheum.100951>
- Picchianti-Diamanti, A., Lorenzetti, R., Chimenti, M. S., Luchetti, M. M., Conigliaro, P., Canofari, C., Benfaremo, D., Bruzzese, V., Laganà, B., Perricone, R., Zullo, A., Caso, F., Costa, L., Tomietto, P., Fabio, F., Scolieri, P., Navarini, L., Cuccagna, E., Severino Martin-Martin, L., ... Scarpa, R. (2020). Enteropathic spondyloarthritis: Results from a large nationwide database analysis. *Autoimmunity Reviews*, 19(2), 4–9. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102457>

- Pitard, V., Roumanes, D., Lafarge, X., Couzi, L., Garrigue, I., Lafon, M. E., Merville, P., Moreau, J. F., & Déchanet-Merville, J. (2008). Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood*, *112*(4), 1317–1324. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-01-136713>
- Placek, K., Schultze, J. L., & Netea, M. G. (2019). Immune memory characteristics of innate lymphoid cells. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *32*(3), 196–203. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000540>
- Qaiyum, Z., Gracey, E., Yao, Y. C., & Inman, R. D. (2019). Integrin and transcriptomic profiles identify a distinctive synovial CD8+ T cell subpopulation in spondyloarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *78*(11), 1566–1575. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215349>
- Reinhardt, A., Yevesa, T., Worbs, T., Lienenklaus, S., Sandrock, I., Oberdörfer, L., Korn, T., Weiss, S., Förster, R., & Prinz, I. (2016). Interleukin-23–Dependent  $\gamma/\delta$  T Cells Produce Interleukin-17 and Accumulate in the Enthesis, Aortic Valve, and Ciliary Body in Mice. *Arthritis and Rheumatology*, *68*(10), 2476–2486. <https://doi.org/10.1002/ART.39732>
- Ribot, J. C., deBarros, A., Pang, D. J., Neves, J. F., Peperzak, V., Roberts, S. J., Girardi, M., Borst, J., Hayday, A. C., Pennington, D. J., & Silva-Santos, B. (2009). CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon- $\gamma$ - and interleukin 17-producing  $\gamma\delta$  T cell subsets. *Nature Immunology*, *10*(4), 427–436. <https://doi.org/10.1038/ni.1717>
- Romero-López, J. P., Gómez-Martínez, D., Domínguez-López, M. L., Jiménez-Zamudio, L., Casasola-Vargas, J. C., Burgos-Vargas, R., & García-Latorre, E. (2020). Differential expression of TLR2 and TLR4 in  $\alpha 4\beta 7$ -positive leukocytes of patients with axial spondyloarthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*, *59*(4), 879–888. <https://doi.org/10.1093/RHEUMATOLOGY/KEZ364>
- Rudwaleit, M., Heijde, D. van der, Landewé, R., Listing, J., Akkoc, N., Brandt, J., Braun, J., Chou, C. T., Collantes-Estevez, E., Dougados, M., Huang, F., Gu, J., Khan, M. A., Kirazli, Y., Maksymowych, W. P., Mielants, H., Sørensen, I. J., Ozgocmen, S., Roussou, E., ... Sieper, J. (2009). The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part II): validation and final selection. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *68*(6), 777 LP – 783. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.108233>
- Rudwaleit, M., Landewé, R., Van Der Heijde, D., Listing, J., Brandt, J., Braun, J., Burgos-Vargas, R., Collantes-Estevez, E., Davis, J., Dijkmans, B., Dougados, M., Emery, P., Van Der Horst-Bruinsma, I. E., Inman, R., Khan, M. A., Leirisalo-Repo, M., Van Der Linden, S., Maksymowych, W. P., Mielants, H., ...

- Sieper, J. (2009). The development of Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for axial spondyloarthritis (part I): classification of paper patients by expert opinion including uncertainty appraisal. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 68(6), 770–776. <https://doi.org/10.1136/ARD.2009.108217>
- Santori, F. R., Huang, P., Van De Pavert, S. A., Douglass, E. F., Leaver, D. J., Haubrich, B. A., Keber, R., Lorbek, G., Konijn, T., Rosales, B. N., Rozman, D., Horvat, S., Rahier, A., Mebius, R. E., Rastinejad, F., Nes, W. D., & Littman, D. R. (2015). Identification of natural ROR $\gamma$  ligands that regulate the development of lymphoid cells. *Cell Metabolism*, 21(2), 286–298. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2015.01.004>
- Schlosstein, L., Terasaki, P. I., Bluestone, R., & Pearson, C. M. (1973). High association of an HL-A antigen, W27, with ankylosing spondylitis. *The New England Journal of Medicine*, 288(14), 704–706. <https://doi.org/10.1056/NEJM197304052881403>
- Sherlock, J. P., Joyce-Shaikh, B., Turner, S. P., Chao, C. C., Sathe, M., Grein, J., Gorman, D. M., Bowman, E. P., McClanahan, T. K., Yearley, J. H., Eberl, G., Buckley, C. D., Kastelein, R. A., Pierce, R. H., Laface, D. M., & Cua, D. J. (2012). IL-23 induces spondyloarthropathy by acting on ROR- $\gamma$ <sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> enthesal resident T cells. *Nature Medicine*, 18(7), 1069–1076. <https://doi.org/10.1038/NM.2817>
- T Yu David and van Tubergen Astrid. (2023, March 5). *Clinical manifestations of axial spondyloarthritis (ankylosing spondylitis and nonradiographic axial spondyloarthritis) in adults*. <https://medilib.ir/uptodate/show/7785>
- Tesmer, L. A., Lundy, S. K., Sarkar, S., & Fox, D. A. (2008). Th17 cells in human disease. *Immunological Reviews*, 223(1), 87–113. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2008.00628.X>
- van de Sande, M. G. H., & Elewaut, D. (2023). Pathophysiology and immunological basis of axial spondyloarthritis. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, 37(3), 101897. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2023.101897>
- Vantourout, P., & Hayday, A. (2013). Six-of-the-best: unique contributions of  $\gamma\delta$  T cells to immunology. *Nature Reviews. Immunology*, 13(2), 88–100. <https://doi.org/10.1038/NRI3384>
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M., & Ugolini, S. (2011). Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science*, 331(6013), 44–49. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1198687>

- Wesch, D., Peters, C., Oberg, H. H., Pietschmann, K., & Kabelitz, D. (2011). Modulation of  $\gamma\delta$  T cell responses by TLR ligands. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 68(14), 2357–2370. <https://doi.org/10.1007/S00018-011-0699-1>
- Wiarda, J. E., & Loving, C. L. (2022). Intraepithelial lymphocytes in the pig intestine: T cell and innate lymphoid cell contributions to intestinal barrier immunity. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.1048708>
- Wu, Y. L., Ding, Y. P., Tanaka, Y., Shen, L. W., Wei, C. H., Minato, N., & Zhang, W. (2014).  $\gamma\delta$  T Cells and Their Potential for Immunotherapy. *International Journal of Biological Sciences*, 10(2), 119–135. <https://doi.org/10.7150/IJBS.7823>

# ANEXOS

## Formulario para la recolección de datos en pacientes con Espondiloartritis axial y periférica

Anexo 1.

Datos demográficos y clínicos recogidos por el investigador

Fecha de la visita de escrutinio:	____/____/____ DD MM AAAA
Fecha de toma de muestra:	____/____/____ DD MM AAAA
Iniciales del paciente (apellidos, nombre(s)) y número de paciente progresivo (01, 02...):	[____/____/____][____/____] (Ejemplo: AMG01) APELLIDOS y NOMBRE # DE PACIENTE
Número de expediente	

Fecha de nacimiento \_\_/\_\_/\_\_

Edad: \_\_ años

Sexo: Masculino / Femenino

Estado de procedencia: \_\_\_\_\_

Ocupación: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

Correo Electrónico: \_\_\_\_\_

Escolaridad: \_\_\_\_\_

Estado Civil: \_\_\_\_\_

Grupo étnico: Mestizo / Caucásico / Negro / Indígena / Desconoce

Actividad Física: Si / No

Actividad física realizada: \_\_\_\_\_

Tiempo destinado a la actividad física: \_\_\_\_\_ (Días, semanas, meses o años)

Tipo: Alto impacto / Bajo impacto

Tratamiento actual del paciente: Si / No

AINE Si / No      Anti IL-17 Si / No  
Sulfazalazina Si / No      Esteroides Si / No  
Antimalaricos Si / No      Metrotexato Si / No  
Anti TNF Si / No

Anexo 2.

Antecedentes relacionados con la enfermedad

Antecedentes familiares de primer grado	Antecedentes familiares de segundo grado
No	No
Desconoce	Desconoce
Artritis Psoriásica	Artritis Psoriásica
Artritis Reactiva	Artritis Reactiva
Espondiloartritis Anquilosante	Espondiloartritis Anquilosante
Espondiloartritis Juvenil	Espondiloartritis Juvenil
Espondiloartritis Axial	Espondiloartritis Axial
Espondiloartritis Periférica	Espondiloartritis Periférica
Uveítis	Uveítis
CUCI	CUCI
Crohn	Crohn
Lumbalgia Inflamatoria Crónica	Lumbalgia Inflamatoria Crónica
Factor Reumatoide positivo	Factor Reumatoide positivo
HLA-B27 positivo	HLA-B27 positivo
Otro: _____	Otro: _____

Tóxicos

Alcoholismo	Tabaquismo	Otros
No. de copas por mes: _____	No. de cigarrillos por mes: _____	Especifique tipo de droga: _____
Años de consumo: _____	Años de consumo: _____	Cuánto consume por mes: _____
Negado	Negado	Años de consumo: _____
		Negado

Comorbilidades

Obesidad	Si / No	Años de evolución: _____	Controlada / Descontrolada
Diabetes	Si / No	Años de evolución: _____	Controlada / Descontrolada
Hipertensión	Si / No	Años de evolución: _____	Controlada / Descontrolada
Cáncer	Si / No	Años de evolución: _____	Controlada / Descontrolada
Osteoporosis	Si / No	Años de evolución: _____	Controlada / Descontrolada
Cardiopatías	Si / No	Años de evolución: _____	Controlada / Descontrolada
Otra: _____		Años de evolución: _____	Controlada / Descontrolada
Antecedentes de traumatismos	Si / No	Tipo: _____	Tratamiento: _____
Antecedentes quirúrgicos	Si / No	Tipo: _____	
Antecedentes de alergias	Si / No	Tipo: _____	
Utilización de esteroides	Si / No	Tipo: _____	

Enfermedades

¿Cuál es la enfermedad que describe a su paciente? (Es posible marcar más de una opción)

- |                                |                              |
|--------------------------------|------------------------------|
| Artritis Psoriásica            | Espondiloartritis Periférica |
| Artritis Reactiva              | Uveítis                      |
| Espondiloartritis Anquilosante | CUCI / Crohn                 |
| Espondiloartritis Juvenil      | Otra: _____                  |

Fecha de diagnóstico: \_\_\_\_\_



Anexo 3.

Síntomas y signos actuales o pasados

Síntomas y Signos	
Síntomas $\geq 3$ meses de duración	Si / No
Lumbalgia	Si / No
Edad al inicio <45 años	Si / No
Artritis	Actual / Pasado / Nunca
Entesitis	Actual / Pasado / Nunca
Dactilitis	Actual / Pasado / Nunca
Tarsitis	Actual / Pasado / Nunca
Uveítis anterior	Actual / Pasado / Nunca
Crohn o CUCI	Actual / Pasado / Nunca
Psoriasis	Actual / Pasado / Nunca
Hallazgos por radiografía	
Sacroilitis (al menos grado II bilateral o grado III unilateral)	Si: _____ (especifique) / No
Evidencia radiológica de formación ósea en márgenes de la articulación	Si: _____ (especifique) / No
Escala SpA-TRI	
Hallazgos por RM	
Edema óseo en secuencia STIR	Si: _____ (especifique) / No
Inflamación en vainas tendinosas	Si: _____ (especifique) / No
Señales de hiperintensidad en articulaciones	Si: _____ (especifique) / No
Sacroilitis	Si / No
Entesitis	Si / No
Dactilitis	Si / No
Tarsitis	Si / No
Laboratorios	
HLA-B27 positivo	Si / No
Factor reumatoide	Si / No
PCR por encima del límite normal	Si: _____ (cuantificación y fecha) / No
VSG	Si: _____ (cuantificación y fecha) / No

Anexo 4.

Criterios de ASAS para Espondiloartritis Axial																																																																									
<p><b>Modalidad de imagen:</b></p> <p>• Sacroiliitis radiográfica:</p> <p>≥2 bilateral: <input type="checkbox"/> Si Grados: Lado der __ Lado izq __ <input type="checkbox"/> No</p> <p>≥3 unilateral: <input type="checkbox"/> Si Grados: Lado der __ Lado izq __ <input type="checkbox"/> No</p> <p>• Sacroiliitis/edema óseo en la secuencia STIR de la RM: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No</p>	<p><b>Modalidad clínica:</b></p> <p>HLA-B27 positivo: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No hecho</p>																																																																								
<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="3">Lista (≥ 1 de los siguientes)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Dolor dorsolumbar inflamatorio</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>Artritis</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>Entesitis (talón)</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>Uveítis</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>Dactilitis</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>Psoriasis</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>Enf Crohn's/colitis ulcerosa</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>Buena respuesta a AINE</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>Historia familiar de SpA</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>HLA-B27</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>Elevación de PCR</td><td>Si</td><td>No</td></tr> </tbody> </table>	Lista (≥ 1 de los siguientes)			Dolor dorsolumbar inflamatorio	Si	No	Artritis	Si	No	Entesitis (talón)	Si	No	Uveítis	Si	No	Dactilitis	Si	No	Psoriasis	Si	No	Enf Crohn's/colitis ulcerosa	Si	No	Buena respuesta a AINE	Si	No	Historia familiar de SpA	Si	No	HLA-B27	Si	No	Elevación de PCR	Si	No	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="3">Lista (≥ 2 de los siguientes)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Dolor dorsolumbar inflamatorio</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>Artritis</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>Entesitis (talón)</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>Uveítis</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>Dactilitis</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>Psoriasis</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>Enf Crohn's/colitis ulcerosa</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>Buena respuesta a AINE</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>Historia familiar de SpA</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>HLA-B27</td><td>Si</td><td>No</td></tr> <tr><td>Elevación de PCR</td><td>Si</td><td>No</td></tr> </tbody> </table>	Lista (≥ 2 de los siguientes)			Dolor dorsolumbar inflamatorio	Si	No	Artritis	Si	No	Entesitis (talón)	Si	No	Uveítis	Si	No	Dactilitis	Si	No	Psoriasis	Si	No	Enf Crohn's/colitis ulcerosa	Si	No	Buena respuesta a AINE	Si	No	Historia familiar de SpA	Si	No	HLA-B27	Si	No	Elevación de PCR	Si	No
Lista (≥ 1 de los siguientes)																																																																									
Dolor dorsolumbar inflamatorio	Si	No																																																																							
Artritis	Si	No																																																																							
Entesitis (talón)	Si	No																																																																							
Uveítis	Si	No																																																																							
Dactilitis	Si	No																																																																							
Psoriasis	Si	No																																																																							
Enf Crohn's/colitis ulcerosa	Si	No																																																																							
Buena respuesta a AINE	Si	No																																																																							
Historia familiar de SpA	Si	No																																																																							
HLA-B27	Si	No																																																																							
Elevación de PCR	Si	No																																																																							
Lista (≥ 2 de los siguientes)																																																																									
Dolor dorsolumbar inflamatorio	Si	No																																																																							
Artritis	Si	No																																																																							
Entesitis (talón)	Si	No																																																																							
Uveítis	Si	No																																																																							
Dactilitis	Si	No																																																																							
Psoriasis	Si	No																																																																							
Enf Crohn's/colitis ulcerosa	Si	No																																																																							
Buena respuesta a AINE	Si	No																																																																							
Historia familiar de SpA	Si	No																																																																							
HLA-B27	Si	No																																																																							
Elevación de PCR	Si	No																																																																							

Anexo 5.

Índice de la actividad de la enfermedad ASDAS-PCR

- Dolor lumbar (0-10)                       Dolor / tumefacción periférica (0-10)  
 Duración de la rigidez matutina (0-10)     Proteína C reactiva (mg/l)  
 Evaluación global del paciente (0-10)

Por favor, ponga una cruz en el número que mejor represente el nivel con el que usted se sienta mayormente identificado, durante la semana pasada

1. ¿Cuánto dolor ha tenido en la zona lumbar?

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Ausente

Muy intenso

2. ¿Cuánto le dura la rigidez matutina?

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Poco tiempo

Mucho tiempo

3. ¿Cuál es la evaluación global del paciente de la actividad de la enfermedad?

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Leve

Grave

4. ¿Cuánto dolor o tumefacción suele tener en sitios periféricos?

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Poco

Mucho

4. ¿Qué cantidad de Proteína C reactiva presenta el paciente en sangre periférica?

Anexo 6.

Manifestaciones articulares y extra-articulares

Manifestaciones extra-articulares		
Manifestación	Especificación	Tratamiento
Uveítis	¿Ha presentado episodio de uveítis? Si / No ¿Fue diagnosticado por el oftalmólogo? Si / No ¿En qué fecha? __ / __ / __ ¿Le dieron tratamiento? Si / No	-AINE sistémico: _____ -Gotas oftálmicas de AINE: _____ -Gotas oftálmicas de corticoesteroide: _____ -Glucocorticoides sistémicos: _____ -Farme clásico: _____ -Farme biológico: _____ -Otro: _____
Psoriasis	¿Ha presentado episodio de psoriasis? Si / No ¿Fue diagnosticado por el dermatólogo? Si / No ¿En qué fecha? __ / __ / __ ¿Le dieron tratamiento? Si / No	-Aplicación local de corticoesteroides: _____ -Terapia PUVA: _____ -Farme clásico: _____ -Farme biológico: _____ -Otro: _____
Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII)	¿Ha presentado episodio de EII? Si / No ¿Fue diagnosticado por colonoscopia? Si / No ¿En qué fecha? __ / __ / __ ¿Le dieron tratamiento? Si / No	-Esteroides vía rectal: _____ -Compuestos 5-ASA: _____ -Corticoesteroides orales: _____ -Farme clásico: _____ -Farme biológico: _____ -Otro: _____

Manifestaciones articulares		
Hombros	¿Ha presentado compromiso articular de hombros? Si / No Bilateral / Unilateral ¿En qué fecha? __ / __ / __	-AINE sistémico: _____ -Farme clásico: _____ -Farme biológico: _____ -Otro: _____
Cadera	¿Ha presentado compromiso de la articulación de cadera? Si / No Bilateral / Unilateral ¿En qué fecha? __ / __ / __	-AINE sistémico: _____ -Farme clásico: _____ -Farme biológico: _____ -Otro: _____
Artritis	¿Ha presentado algún episodio de artritis? Si / No ¿En qué región(es) del cuerpo? _____ ¿Fue identificada por el reumatólogo? Si / No ¿Cómo suele presentarse? Transitorio / Continuo / Intermitente	-AINE sistémico: _____ -Farme clásico: _____ -Farme biológico: _____ -Otro: _____



Anexo 7.

Conteo articular de los miembros inferiores

Conteo articular de los miembros inferiores												
Articulación	Derecha						Izquierda					
	Dolor		Inflamación		Disminución de la movilidad		Dolor		Inflamación		Disminución de la movilidad	
	Si	No	-----		Si	No	Si	No	-----		Si	No
Coxofemoral	Si	No	-----		Si	No	Si	No	-----		Si	No
Rodilla	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
Tobillo	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
Tarso	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
MTF1	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
MTF2	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
MTF3	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
MTF4	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
MTF5	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
Sacroiliaca	Si	No	-----		-----		Si	No	-----		-----	



Anexo 8.

**INDICE FUNCIONAL BASFI**

Por favor ponga una cruz en el número que mejor represente el nivel de habilidad que tuvo usted en cada una de las siguientes actividades, durante la semana pasada

1. *Ponerse las medias o los calcetines sin ayuda ni aparatos (ej. un gancho para los calcetines)*

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

fácil imposible

2. *Inclinarse hacia delante, doblando la cintura, para recoger una pluma del piso, sin ayuda de un aparato*

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

fácil imposible

3. *Alcanzar algo que se encuentra en una repisa (estante) alta sin ayuda o aparatos (ej. un jalador)*

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

fácil imposible

4. *Levantarse de una silla que no tenga apoya-brazos, sin usar sus manos ni ninguna otra ayuda*

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

fácil imposible

5. *Levantarse del piso sin ayuda, estando acostado en el suelo boca arriba*

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

fácil imposible

6. *Estar parado sin apoyo por 10 minutos, sin molestias*

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

fácil imposible

7. *Subir de 12 a 15 escalones sin usar el pasamanos ni una andadera, subiendo los escalones de uno en uno*

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

fácil imposible

8. *Mirar por encima del hombro sin girar su cuerpo*

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

fácil imposible

9. *Hacer actividades que necesiten un gran esfuerzo físico (por ejemplo ejercicios de fisioterapia, jardinería y deportes)*

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

fácil imposible

10. *Hacer actividades que duren todo el día, sea en casa o en el trabajo*

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

fácil imposible



Anexo 9.

**INDICE DE ACTIVIDAD (BASDAI)**

Por favor marque con una cruz en cada una de las escalas de abajo, para indicar las respuestas relacionadas a cómo se sintió usted la semana pasada.

1. ¿Cómo describiría el grado de cansancio o fatiga que ha tenido?

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Nada muy intenso

2. ¿Qué tanto dolor ha tenido por su enfermedad en el cuello, la espalda o la cadera?

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Nada muy intenso

3. ¿Qué tanto dolor o inflamación ha tenido en otras articulaciones, diferentes al cuello, la espalda o la cadera?

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Nada muy intenso

4. ¿Qué tanto malestar ha tenido en sitios que duelen al tocar o al presionar?

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Nada muy intenso

5. ¿Qué tanta rigidez ha tenido en la mañana desde el momento que se despierta?

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Nada muy intenso

6. ¿Cuánto le dura esa rigidez?

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

0 horas 1 hora 2 horas o más



Anexo 10.

INDICE DE MOVILIDAD (BASMI)

<b>Columna cervical</b>	<i>Flexión</i>		
	<i>Extensión</i>		
	<i>Rotación</i>		
	<i>Distancia occipucio-pared</i>		
	<i>Distancia trago-pared</i>		
<b>Columna dorsolumbar</b>	<i>Flexión anterior</i>		
	<i>Shöber modificado</i>		
	<i>Distancia dedo-piso</i>		
	<i>Flexión lateral</i>		
	<i>Expansión torácica</i>		
<b>Cadera</b>	<i>Distancia intermaleolar</i>		
	<i>Rotación interna de cadera</i>		



Anexo 11.

Esquema del número de articulaciones afectadas

