



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

COORDINACIÓN GENERAL ACADÉMICA

Coordinación de Bibliotecas

Biblioteca Digital

La presente tesis es publicada a texto completo en virtud de que el autor ha dado su autorización por escrito para la incorporación del documento a la Biblioteca Digital y al Repositorio Institucional de la Universidad de Guadalajara, esto sin sufrir menoscabo sobre sus derechos como autor de la obra y los usos que posteriormente quiera darle a la misma.

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA



TESIS DE GRADO DE DOCTORADO

EXPRESIÓN DE CD158b (KIR2DL2/S2/L3) EN CÉLULAS NK Y LINFOCITOS T  
CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> Y SU ASOCIACIÓN CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON  
*DMARDs* EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

ALUMNO

M. EN C. ERANDI ENIF VELARDE DE LA CRUZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. EN C. PEDRO ERNESTO SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

CODIRECTOR DE TESIS

DRA. EN C. MARÍA GUADALUPE RAMÍREZ DUEÑAS

GUADALAJARA, JALISCO, MARTES 13 MARZO DE 2018

**La presente Tesis de doctorado fue apoyada por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el No. del proyecto: 272992, del programa del el Fondo Sectorial de Investigación en Salud (FOSISS 2016). FONSEC, SSA / IMSS / ISSSTE / SALUD 2016-1**

**Erandi Enif Velarde de la Cruz, becaria de febrero 2014 hasta enero 2018 por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de 305860 y código UDG: 214298428**



## Agradecimientos

A mi familia y amigos, gracias por su apoyo incondicional; en especial a mis padres por ser mi ejemplo de dedicación, perseverancia y esfuerzo.

A mis directores de tesis y sinodales, por su paciencia, por ser mis guías en mi crecimiento profesional y personal.





# ÍNDICE

<b>I. ÍNDICE DE ILUSTRACIONES .....</b>	<b>III</b>
<b>II. ÍNDICE DE CUADROS .....</b>	<b>IV</b>
<b>III. LISTA DE ABREVIACIONES .....</b>	<b>V</b>
<b>1 RESUMEN .....</b>	<b>VIII</b>
<b>2 ABSTRACT.....</b>	<b>IX</b>
<b>3 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>X</b>
<b>4 ANTECEDENTES .....</b>	<b>12</b>
4.1 Artritis reumatoide .....	12
4.2 Receptores tipo inmunoglobulina de las células NK.....	35
4.3 Estudios acerca de KIR en AR y respuesta a tratamiento .....	40
<b>5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>42</b>
<b>6 HIPÓTESIS .....</b>	<b>43</b>
<b>7 OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>43</b>
7.1 Objetivos particulares .....	43
<b>8 DISEÑO METODOLÓGICO .....</b>	<b>44</b>
<b>9 DIAGRAMA DE FLUJO .....</b>	<b>47</b>
<b>10 METODOLOGÍA .....</b>	<b>48</b>
10.1 Captación de pacientes y grupo de referencia .....	48
10.2 Tratamiento de los pacientes vírgenes a tratamiento .....	48
10.3 Toma de sangre periférica.....	49
10.4 Identificación de las poblaciones celulares NK y T CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>null</sup> por citometría de flujo.....	49
10.5 Cuantificación de niveles séricos de citocinas IL-15, IL-21 y autoanticuerpos.....	53
10.6 Análisis estadístico.....	54
<b>11 RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
11.1 Características clínico-demográficas de pacientes con AR y grupo de referencia.	55
11.2 Poblaciones celulares NK y T CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>null</sup> en la respuesta a tratamiento.....	56
11.3 Expresión de CD158b en la respuesta a tratamiento. ....	61
11.4 Niveles de IL-15 e IL-21 en respuesta al tratamiento .....	64
11.5 Auto-anticuerpos y respuesta al tratamiento .....	66

<b>12 DISCUSIÓN .....</b>	<b>73</b>
<b>13 CONCLUSIONES .....</b>	<b>83</b>
<b>14 LIMITACIONES.....</b>	<b>84</b>
<b>15 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>85</b>
<b>16 BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>86</b>
<b>17 ANEXO I .....</b>	<b>96</b>
17.1 Carta de consentimiento informado.....	96
17.2 Formato del historial clínico de individuos en estudio.....	97
17.3 Índice articular del paciente.....	99
17.4 Escala Análoga visual del paciente .....	100
<b>18 ANEXO II .....</b>	<b>101</b>
18.1 Genotipificación de <i>KIR2DL2/S2/L3</i> .....	101
<b>19 ANEXO III .....</b>	<b>104</b>
19.1 Poblaciones celulares y expresión de CD158b en respuesta a tratamiento .....	104
19.2 Expresión de CD158b en respuesta a tratamiento .....	104
19.3 Niveles séricos de IL-15 e IL-21 en respuesta al tratamiento .....	104
<b>20 ANEXOS IV.....</b>	<b>106</b>
20.1 Artículos publicados .....	106
20.2 Cursos asistidos .....	108
20.3 Posters presentados .....	109
20.4 Memorias de congreso .....	111
20.5 Presentación oral .....	112

## I. ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Figura 1.</b> Articulaciones afectadas en artritis reumatoide. ....	13
<b>Figura 2.</b> Inmunopatología de la artritis reumatoide .....	24
<b>Figura 3.</b> Interacción entre las células NK y T autorreactivas.....	31
<b>Figura 4.</b> Receptores expresados en células T CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup> y CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>null</sup> .....	34
<b>Figura 5.</b> Estructura génica y proteica de <i>KIR</i> . .....	36
<b>Figura 6.</b> Representación de la delimitación de poblaciones celulares.....	51
<b>Figura 7.</b> Determinación de poblaciones celulares NK y T CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>null</sup> CD158b <sup>+</sup> .....	52
<b>Figura 8.</b> Poblaciones celulares en células NK y T CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>null</sup> en pacientes con AR y grupo de referencia.....	58
<b>Figura 9.</b> Células T totales y subpoblaciones de células NK en grupo de referencia y pacientes AR con Tx en curso. ....	59
<b>Figura 10.</b> Células T totales y subpoblaciones de células NK en respondedores y no respondedores.....	60
<b>Figura 11.</b> Expresión de CD158b en células T CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>null</sup> y células NK en pacientes con AR y grupo de referencia.....	62
<b>Figura 12.</b> Expresión de CD158b de acuerdo al genotipo <i>KIR2DL2/2DS2/2DL3</i> de pacientes con AR y grupo de referencia. ....	64
<b>Figura 13.</b> Niveles de IL-15 e IL-21 en respuesta a tratamiento en pacientes con AR y grupo de referencia.....	65
<b>Figura 14.</b> Niveles séricos de IL-21 y la expresión CD158b en células T CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>null</sup> de pacientes con AR y grupo de referencia. ....	66
<b>Figura 15.</b> Poblaciones celulares de pacientes anti-CCP +/- y grupo de referencia. ....	67
<b>Figura 16.</b> Expresión de CD158b de pacientes anti-CCP +/- y grupo de referencia. ....	68
<b>Figura 17.</b> Niveles séricos de IL-21 y niveles de anti-CCP de pacientes con AR y grupo de referencia.....	69
<b>Figura 18.</b> Poblaciones celulares de pacientes FR +/- y grupo de referencia.....	70
<b>Figura 19.</b> Expresión de CD158b en pacientes FR +/- y grupo de referencia.....	71
<b>Figura 20.</b> Niveles séricos de IL-21 y niveles de factor reumatoide de pacientes con AR y grupo de referencia.....	72
<b>Figura 21.</b> Degeneración de las células NK. ....	79
<b>Figura 22.</b> Genotipificación de genes <i>KIR2DL2</i> , <i>2DL3</i> y <i>2DS2</i> .....	103



## II. ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Manifestaciones extraarticulares en artritis reumatoide .....	14
<b>Cuadro 2.</b> Criterios de clasificación ACR/EULAR 2010 .....	15
<b>Cuadro 3.</b> Genes asociados con la patogénesis de artritis reumatoide .....	17
<b>Cuadro 4.</b> Clasificación de los factores pronóstico en artritis reumatoide.....	25
<b>Cuadro 5.</b> Drogas modificadoras de la enfermedad y sus efectos celulares .....	27
<b>Cuadro 6.</b> Predictores de respuesta a metotrexate y otros <i>DMARDs</i> .....	29
<b>Cuadro 7.</b> Biología de las poblaciones T CD4+CD28 <sup>null</sup> y CD4+CD28 <sup>+</sup> .....	33
<b>Cuadro 8.</b> Ligando de los receptores KIR.....	37
<b>Cuadro 9.</b> Expresión de receptores KIR en células NK y T .....	38
<b>Cuadro 10.</b> Criterios de respuesta <i>EULAR</i> de acuerdo al DAS 28 .....	49
<b>Cuadro 11.</b> Titulación de anticuerpos .....	50
<b>Cuadro 12.</b> Protocolo multiparamétrico .....	50
<b>Cuadro 13.</b> Características clínicas de los pacientes con AR.....	56
<b>Cuadro 14.</b> Genes <i>KIR</i> en pacientes con AR y grupo de referencia.....	63
<b>Cuadro 15.</b> Genes <i>KIR</i> en respondedores, no respondedores y grupo de referencia .....	63
<b>Cuadro 16.</b> <i>Primers</i> para genotipificar <i>KIR2DL2/S2/L3</i> por <i>PCR-SSP</i> .....	102
<b>Cuadro 17.</b> Condiciones de <i>PCR-SSP</i> para <i>KIR</i> .....	103
<b>Cuadro 18.</b> Porcentajes de poblaciones celulares en respuesta al tratamiento.....	104
<b>Cuadro 19.</b> Expresión de CD158b en respuesta al tratamiento.....	104
<b>Cuadro 20.</b> Niveles de IL-15 e IL-21 en respuesta a tratamiento .....	104
<b>Cuadro 21.</b> Correlación de niveles de IL-15 con la expresión de CD158b .....	105
<b>Cuadro 22.</b> Correlación de niveles de IL-21 con la expresión de CD158b .....	105

### III. LISTA DE ABREVIACIONES

<b>ACPA</b>	Autoanticuerpos contra péptidos citrulinados
<b>ACR</b>	Siglas en inglés, <i>American College of Rheumatology</i>
<b>ACR20/50/70</b>	Siglas en inglés, <i>American College of Rheumatology 20 / 50 / 70 %</i>
<b>ADCC</b>	Del inglés, <i>antibody dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
<b>AMM</b>	De las siglas, Asociación Médica Mundial
<b>Anti-CCP</b>	Anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados
<b>APC</b>	Del inglés, <i>Antigen-presenting cell</i>
<b>AR</b>	Artritis reumatoide
<b>Buffer TBE</b>	Buffer Tris/Borato/EDTA
<b>CD</b>	Del inglés, <i>Cluster differentiation</i>
<b>CDAI</b>	Del inglés, <i>Clinical Disease Activity Index</i>
<b>CIBO</b>	De las siglas, Centro de Investigación Biomédica de Occidente
<b>CTLA-4</b>	Del inglés, <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
<b>CUCS</b>	Centro Universitario de Ciencias de la Salud
<b>DAS</b>	Del inglés, <i>Disease Activity Score</i>
<b>DAS28</b>	Del inglés, <i>Disease Activity Score - 28 joints</i>
<b>dNTPs</b>	Del inglés, <i>deoxynucleoside triphosphate</i>
<b>DMARDs</b>	Siglas en inglés, <i>Disease-Modifying Antirheumatic Drugs</i>
<b>DNA</b>	Del inglés, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>EULAR</b>	Siglas en inglés, <i>European Union League Against Rheumatism</i>
<b>EBV</b>	Del inglés, <i>Epstein-Barr Virus</i>
<b>EGP</b>	Evaluación global del paciente
<b>Fc</b>	Fracción cristalizabile
<b>FMO</b>	Del inglés, <i>Fluorescence minus one</i>
<b>FP</b>	Factores pronósticos
<b>FR</b>	Factor Reumatoide
<b>FSC</b>	Del inglés, <i>Forward scatter</i>
<b>GM-CSF</b>	Del inglés, <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
<b>GWAS</b>	Del inglés, <i>Genome-Wide Association Study</i>
<b>HAQ-DI</b>	Del inglés, <i>Health assessment questionnaire disability index</i>
<b>HLA</b>	Del inglés, <i>Human Leukocyte Antigen</i>
<b>ICAM-1</b>	Del inglés, <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>

<b>IFM</b>	Intensidad de fluorescencia media
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IFP</b>	Interfalángicas proximales
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IICB</b>	De las siglas, Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas
<b>IL</b>	Interleucina
<b>ITIM</b>	Del inglés, <i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
<b>ITAM</b>	Del inglés, <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
<b>K<sub>2</sub>EDTA</b>	Sal dipotásica del ácido etilendaimintetracético
<b>KIR</b>	Del inglés, <i>Killer-cell immunoglobulin-like receptors</i>
<b>LEF</b>	Leflunomida
<b>LFA-1</b>	Del inglés, <i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
<b>MCF</b>	Metacarpofalángicas
<b>MHC</b>	Del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex</i>
<b>MMPs</b>	Del inglés, <i>Matrix metalloproteinases</i>
<b>mRNA</b>	Del inglés, <i>messenger Ribonucleic acid</i>
<b>MTF</b>	Metatarsofalángicas
<b>MTX</b>	Metotrexate
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	Sal disódica del ácido etilendaimintetracético
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	Cloruro de amonio
<b>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de amonio
<b>NK</b>	Del inglés, <i>Natural Killers</i>
<b>NSAIDs</b>	Del inglés, <i>Nonsteroidal Anti-Inflammatory-Drugs</i>
<b>PADI-4</b>	Del inglés, <i>protein-arginine deiminase type-4</i>
<b>pCr</b>	Proteína C Reactiva
<b>pDC</b>	Del inglés, <i>plasmocitoid dendritic cells</i>
<b>PTPN22</b>	Del inglés, <i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22</i>
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SE</b>	Del inglés, <i>Shared Epitope</i>
<b>SSC</b>	Del inglés, <i>Side Scatter</i>
<b>SSP-PCR</b>	Del inglés, <i>Specific Sequence Primers – Polymerase Chain Reaction</i>
<b>SSZ</b>	Sulfasalazina

<b>TCR</b>	Del inglés, <i>T cell receptor</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Siglas en inglés, <i>Transforming Growth Factor Beta</i>
<b>Th</b>	Del inglés <i>T helper</i>
<b>TLR</b>	Del inglés, <i>Toll-Like Receptor</i>
<b>TNF</b>	Del inglés, <i>Tumor Necrosis Factor</i>
<b>TNFAIP12</b>	Del inglés, <i>Tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced Protein 2</i>
<b>TNFRSF14</b>	Del inglés: <i>Tumor Necrosis Factor Super Family member 14</i>
<b>TRAF1</b>	Del inglés, <i>TNF Receptor Associated Factor 1</i>
<b>Tx</b>	Tratamiento
<b>VEFG</b>	Del inglés, <i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>VSG</b>	Velocidad de Sedimentación Globular

## 1 RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, inflamatoria y crónica que daña a las articulaciones. Las células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> y NK participan en la patología y la activación de ambos tipos celulares es mediada por receptores KIR (CD158). Por lo que el objetivo de este trabajo es evaluar la expresión de CD158b (KIR2DL2/S2/L3) de estas poblaciones celulares en la respuesta al tratamiento (Tx) con MTX en pacientes con AR.

Se incluyeron 20 individuos sanos y 40 pacientes con AR: 20 con Tx en curso, 20 vírgenes a Tx. A éstos últimos, se les inició Tx con MTX, se les dió seguimiento de 3 meses y se clasificaron de acuerdo a su respuesta al Tx. Se evaluó la expresión de CD158b en las poblaciones T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> y NK mediante citometría de flujo y se cuantificaron los niveles séricos de IL-15, IL-21, anti-CCP y FR por ELISA. Para el análisis estadístico, se consideró una diferencia significativa de  $p < 0.05$ .

En vírgenes a Tx, comparado con el grupo de referencia, se observó un mayor porcentaje de células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> (3.59% vs 0.67%  $p = 0.02$ ) y su expresión de CD158b (IFM:  $4357 \pm 2674$  vs  $1719 \pm 1322$ ,  $p = 0.019$ ); así como disminución de la expresión de CD158b en células NK (IFM:  $4357 \pm 2674$  vs  $6969 \pm 3745$ ,  $p = 0.048$ ). En pacientes vírgenes a Tx, se observaron niveles más altos de IL-15 ( $148.8 \pm 41.89$  pg/mL) e IL-21 ( $228.2 \pm 314$  pg/mL) comparados con el grupo de referencia (IL-15:  $107.9 \pm 55.67$  pg/mL,  $p = 0.035$ ; IL-21:  $38.02 \pm 25.64$  pg/mL,  $p = 0.039$ ) y pacientes con Tx en curso (IL-15:  $73.86 \pm 65.27$  pg/mL,  $p = 0.001$ ; IL-21:  $45.10 \pm 24.82$  pg/mL,  $p = 0.043$ ). En cuanto a respuesta a tratamiento (evaluada a los 3 meses de iniciado el Tx), en no respondedores se observó disminución de células NK (7.05% vs 15.17%,  $p = 0.033$ ) y su expresión de CD158b ( $5624 \pm 2730$  vs  $9324 \pm 3495$ ;  $p = 0.004$ ) comparado con respondedores; así mismo se observó el aumento de T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> (1.18% vs 3.69%,  $p = 0.002$ ) y su expresión de CD158b, el cual se correlacionó con mayores niveles de IL-21 ( $r = 0.70$ ,  $p = 0.016$ ).

Nuestros resultados sugieren que el MTX promueve la regeneración de las células NK, y éstas a su vez, promueven la buena respuesta al Tx. Mientras que niveles elevados de IL-21 pueden influir en la falla de la respuesta al tratamiento, al favorecer el incremento de células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> y su expresión de CD158b.

---

## 2 ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune, autoinflammatory and chronic disease that affects the synovial joints. The T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> and NK cells participate in the disease pathology and the activation and function of both populations are regulated by KIR (CD158) receptors. Therefore, the aim of this study was to evaluate CD158b (KIR2DL2/S2/L3) expression in T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> and NK in treatment (Tx) response in RA patients.

We included 20 healthy subjects and 40 RA-diagnosed patients: 20 naïve Tx and 20 with current Tx. Naïve Tx patients were initially treated with MTX, assessed at 3 months and classified according to their Tx response. We evaluate the CD158b expression in the T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> and NK populations by flow cytometry and serum levels of IL-15, IL-21, anti-CCP and FR were quantified by ELISA. Statistical analysis was performed where a significant difference of  $p < 0.05$  was considered.

In naïve Tx patients, T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> cell and its CD158b expression were increased in RA patients compared with reference group (3.59% vs 0.67%  $p = 0.02$  and  $4357 \pm 2674$  vs  $1719 \pm 1322$ ,  $p = 0.019$ , respectively); also, the CD158b expression of NK cells in naïve Tx patients were decreased compared with reference group ( $4357 \pm 2674$  vs  $6969 \pm 3745$ ,  $p = 0.048$ ). IL-15 ( $148.8 \pm 41.89$  pg/mL) and IL-21 ( $228.2 \pm 314$  pg/mL) serum levels of naïve Tx patients were increase compare with group reference (IL-15:  $107.9 \pm 55.67$  pg/mL,  $p = 0.035$ ; IL-21:  $38.02 \pm 25.64$  pg/mL,  $p = 0.039$ ) and current Tx patients (IL-15:  $73.86 \pm 65.27$  pg/mL,  $p = 0.001$ ; IL-21:  $45.10 \pm 24.82$  pg/mL,  $p = 0.043$ ). In response to Tx, non-responders had a decreased of NK cells and its CD158b expression (7.05% vs 15.17%,  $p = 0.033$  and  $5624 \pm 2730$  vs  $9324 \pm 3495$ ;  $p = 0.004$ ) and an increase of T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> (1.18% vs 3.69%,  $p = 0.002$ ) and its CD158b expression associated with IL-21 serum levels ( $r = 0.70$ ,  $p = 0.016$ ).

Our results suggest that MTX promote NK regeneration, which in turn, influence the good response to Tx. Meanwhile, high levels of IL21 can influence the poor response to Tx, favoring the increased of CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> T cells population and their CD158b expression.

---

### 3 INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica que afecta principalmente a las articulaciones, que lleva a una reducción de la capacidad funcional y calidad de vida del paciente. Es considerada un síndrome clínico heterogéneo, donde la variabilidad entre los subgrupos clínicos afecta a la progresión, severidad de la enfermedad y respuesta al tratamiento (Scott, Wolfe et al. 2010, Boissier, Semerano et al. 2012).

Dentro de la historia natural de la enfermedad, la AR se puede dividir en tres etapas: AR muy temprana, el cual abarca 3 meses de la aparición de los síntomas; AR temprana, que considera los primeros 12 meses a partir de la aparición de los síntomas; y AR establecida, después del año de aparición o con la aparición del *pannus* que lleva a la erosión del hueso. La diferencia entre las etapas sugiere que las poblaciones celulares implicadas son diferentes y por lo tanto esto puede influir en la severidad de la AR y la respuesta al tratamiento (Deane 2012).

En la patología de AR se ha observado la participación de las poblaciones celulares NK y T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>. La subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> se ha asociado con la erosión y destrucción del hueso y cartílago; mientras que las células NK presentan un papel dual: 1) como promotores del proceso autoinmune a través de la producción de citocinas inflamatorias; y 2) como protectores, mediante su función citotóxica que permite erradicar células autoinmunes (Shi and Zhou 2011, Maly and Schirmer 2015, Popko and Gorska 2015).

Ambas poblaciones celulares expresan receptores KIR que regulan su activación y función, además, cabe mencionar que la presencia de citocinas como IL-15 e IL-21 influyen en la expresión de los receptores KIR en células NK, lo que puede comprometer la funcionalidad de esta población celular (de Rham, Ferrari-Lacraz et al. 2007, Torres-García, Barquera et al. 2008, Dumitriu 2015). Sin embargo, todavía no se comprende en su totalidad el papel de las diferentes poblaciones de células NK y células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en el curso de la enfermedad y su posible influencia en la respuesta a *DMARDs* (del inglés, *Disease-Modifying Antirheumatic Drugs*) (Shi and Zhou 2011, Dumitriu 2015).

Estudios previos sugieren que los receptores KIR pueden estar asociados a AR, así como a su severidad y respuesta a *DMARDs*. En el occidente de México, nuestro equipo de trabajo observó:

- 1) La asociación de los genes *KIR2DL2/S2* como factor de susceptibilidad y *KIR2DL3* como factor de protección en AR (Ramirez-De los Santos, Sanchez-Hernandez et al. 2012)
- 2) El incremento de las poblaciones  $CD4^+CD28^{null}KIR^+$  y niveles de IL-21 en pacientes con AR (Ramírez-de los Santos, 2014)
- 3) La asociación del genotipo *KIR2DL2/S2* con la respuesta al tratamiento con *DMARDs* (Velarde-de la Cruz, Sanchez-Hernandez et al. 2016)

Sin embargo, se desconoce cuál es la participación de los receptores *KIR2DL2/S2/L3* en las células NK y T  $CD4^+CD28^{null}$  en la progresión, severidad de la enfermedad y respuesta al tratamiento con *DMARDs*.

Por lo que, la evaluación de la expresión de los receptores *KIR2DL2*, *KIR2DS2* y *KIR2DL3* en las poblaciones celulares NK y T  $CD4^+CD28^{null}$  durante el curso de la enfermedad y su respuesta al tratamiento, permitirá una mejor comprensión de su participación e influencia en la respuesta en tratamiento.



---

## 4 ANTECEDENTES

### 4.1 Artritis reumatoide

#### 4.1.1 Definición

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, inflamatoria crónica y sistémica de etiología multifactorial que se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos, hiperplasia sinovial y complicaciones sistémicas que llevan a la destrucción progresiva de las articulaciones (Scott, Wolfe *et al.* 2010, McInnes and Schett 2011).

Se caracteriza por ser una enfermedad autoinmune que resulta de una desregulación de los mecanismos de autotolerancia, con una compleja red de interacciones entre la inmunidad innata y adaptativa. La pérdida de la tolerancia es ocasionada por varios procesos fisiopatológicos que llevan al reconocimiento de lo propio (McInnes and Schett 2011, Boissier, Semerano *et al.* 2012).

Se considera una enfermedad inflamatoria crónica que involucra a varias citocinas que actúan en serie y en paralelo. Estas conducen a un daño progresivo e irreversible de estructuras articulares y periarticulares que afectan la calidad y la esperanza de vida del paciente, y en consecuencia tiene un alto impacto económico y social (Boissier, Semerano *et al.* 2012).

La interacción de los factores genéticos y ambientales lleva a la generación de diferentes subgrupos de AR, que consideran a la enfermedad como un síndrome clínico heterogéneo. La presencia de diferentes subgrupos clínicos abarca una variedad de cascadas inflamatorias asociadas con la progresión, severidad de la enfermedad y respuesta al tratamiento (Pratt, Isaacs *et al.* 2009, McInnes and Schett 2011).

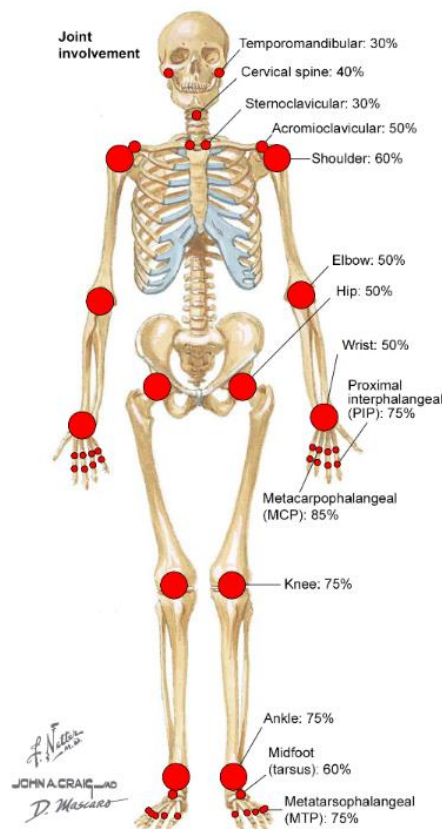
Estos diferentes subgrupos, pueden clasificar a la AR de acuerdo a las manifestaciones clínicas que presenta: edad de inicio, tiempo de evolución, estado funcional del paciente, cambios radiográficos, manifestaciones extraarticulares y presencia de autoanticuerpos. Entre estos últimos se encuentran factor reumatoide (FR) y autoanticuerpos contra péptidos citrulinados (ACPA) (Pratt, Isaacs *et al.* 2009, Scott, Wolfe *et al.* 2010)

## 4.1.2 Manifestaciones clínicas

Las principales manifestaciones clínicas pueden ser tanto locales como sistémicas que son consecuencia del proceso inflamatorio y proliferativo característico de la enfermedad. La principal manifestación clínica es la afección de las articulaciones diartrodiales y estructuras periféricas (ligamento, tendón y músculo). La AR presenta manifestaciones sistémicas desde generales hasta alteraciones de diversos órganos (Pratt, Isaacs *et al.* 2009, Boissier, Semerano *et al.* 2012)

### 4.1.2.1 Manifestaciones articulares

El principal blanco de la AR son las articulaciones diartrodiales, puede ser en cualquier articulación sinovial de forma bilateral y simétrica, las más frecuentes son: interfalángicas proximales (IFP), metacarpofalángicas (MCF), metatarsofalángicas (MTF), muñecas y cadera (Figura 1) (Pratt, Isaacs *et al.* 2009, Scott, Wolfe *et al.* 2010, McInnes and Schett 2011).



**Figura 1. Articulaciones afectadas en artritis reumatoide.**

Las articulaciones más frecuentemente afectadas por la AR se encuentran señaladas en círculos rojos

En la articulación, la inflamación de la sinovia es responsable del dolor, hipersensibilidad, rigidez y disminución de la funcionalidad articular. Las estructuras periféricas sufren alteraciones que dan como consecuencia la disminución de la movilidad, hipotrofia muscular y deformaciones (McInnes and Schett 2011, Smolen, Aletaha *et al.* 2016).

#### 4.1.2.2 Manifestaciones extraarticulares

Las manifestaciones extraarticulares incluyen síntomas generales como la fatiga, pérdida de peso y ocasionalmente fiebre; además de alteraciones en diferentes órganos, como piel, pulmones, hígado, cerebro, entre otros (Cuadro 1). Cerca del 30% de los pacientes presentan desordenes extraarticulares, los cuales empeoran en individuos con la enfermedad activa (Scott, Wolfe *et al.* 2010).

**Cuadro 1. Manifestaciones extraarticulares en artritis reumatoide**

Manifestaciones extraarticulares	
<b>Cutánea</b>	Nódulos subcutáneos
<b>Glándulas exocrinas y mucosas</b>	Fibrosis glandular, Síndrome de Sjögren secundario, amiloidosis y calidad de secreciones
<b>Hematológicas, hepáticos y linfáticos</b>	Anemia, trombocitosis y linfoma
<b>Pulmonares</b>	Fibrosis pulmonar, pleuritis
<b>Oftalmológicas</b>	Escleritis y escleromalacias
<b>Cardiovasculares</b>	Pericarditis, vasculitis, miocarditis, arterioesclerosis
<b>Musculares y óseos</b>	Sarcopenia, Osteoporosis y fracturas
<b>Neurológicas y Psicológicas</b>	Polineuritis, mononeuritis simple o múltiple, depresión, fatiga y reducción de funciones cognitivas

(Scott, Wolfe *et al.* 2010, McInnes and Schett 2011)

Cabe mencionar que algunas manifestaciones extraarticulares se pueden reflejar en anormalidades sistémicas que pueden ser encontradas en muestras de sangre inclusive antes de la aparición de la sinovitis, como es la presencia de FR, ACPA y niveles elevados de algunas citocinas (IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ) (Pieringer and Studnicka-Benke 2013).

#### 4.1.3 Criterios de clasificación

Los criterios actuales para la clasificación de AR fueron desarrollados en el 2010 por el Colegio Americano de Reumatología (ACR, siglas en inglés, *American College of Rheumatology*) en conjunto con la Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR, siglas en

inglés, *European Union League Against Rheumatism*) con el objetivo de identificar pacientes en etapas tempranas, para dar una intervención oportuna que controle la inflamación y reduzca o prevenga el daño articular (Aletaha, Neogi *et al.* 2010).

Los criterios actuales están divididos en 4 categorías: articulaciones afectadas, serología (autoanticuerpos), reactantes de fase aguda y tiempo de duración de los síntomas. Los individuos son valorados de acuerdo a una escala de 0 a 10, donde aquellos que presenten una puntuación mayor o igual a 6 se consideran como AR definitiva (Cuadro 2) (Aletaha, Neogi *et al.* 2010).

**Cuadro 2. Criterios de clasificación ACR/EULAR 2010**

**Población objetivo: pacientes**

1. Mínimo una articulación con una sinovitis clínica definida	
2. Sinovitis que no es explicada por otra enfermedad	
<b>A. Articulaciones afectadas</b>	<b>(0-5)</b>
• 1 articulación larga involucrada	0
• 2 - 10 articulaciones largas involucradas	1
• 1 - 3 pequeña(s) articulación(es) (con o sin articulaciones largas)	2
• 4 - 10 pequeñas articulaciones (con o sin articulaciones largas)	3
• > 10 articulaciones (al menos una articulación pequeña)	5
<b>B. Serología</b>	<b>(0-3)</b>
• Negativo FR o ACPA	0
• Positivo FR o ACPA en bajos niveles	2
• Positivo FR o ACPA en altos niveles	3
<b>C. Reactantes de fase aguda</b>	<b>(0-1)</b>
• Niveles normales pCr y VSG	0
• Niveles anormales pCr y VSG	1
<b>D. Duración de los síntomas</b>	<b>(0-1)</b>
• < 6 semanas	0
• ≥ 6 semanas	1

Puntaje mayor o igual a 6 o presentar erosiones o enfermedades de larga duración que cumplan los criterios califica como AR temprana. FR: Factor reumatoide; ACPA: auto-anticuerpos contra péptidos citrulinados; pCr: proteína C reactiva; VSG: velocidad de sedimentación globular. Valores normales de FR y ACPA en sangre se sitúa de <1:80 o <40 U/mL y <15 U/mL, respectivamente (Aletaha, Neogi *et al.* 2010).

**4.1.4 Epidemiología**

La AR es una enfermedad considerada universal, que no se encuentra asociada a ninguna región, ni condiciones climáticas particulares (Tobon, Youinou *et al.* 2010). Sin embargo, la incidencia y prevalencia de la enfermedad varía entre las poblaciones, lo cual sugiere que existen diferentes factores genéticos y ambientales involucrados (Scott, Wolfe *et al.* 2010, Tobon, Youinou *et al.* 2010).

Estudios en diferentes poblaciones estiman que la prevalencia mundial de AR se encuentra entre 0.5-1% (Moroni, Bianchi *et al.* 2012). En Norteamérica, se presenta una incidencia de 20-50 casos por 100,000 habitantes/año y una prevalencia de 0.5-1.1% mientras los países mediterráneos presentan menores frecuencias de esta enfermedad (Scott, Wolfe *et al.* 2010, Tobon, Youinou *et al.* 2010). En Latinoamérica varía de 0.4 a 1.6% y en el caso de México es del 1.6% (Cardiel and Rojas-Serrano 2002, Burgos-Vargas, Catoggio *et al.* 2013).

La frecuencia de la enfermedad varía de acuerdo a la edad (más frecuente en la quinta década de vida) y el género (más frecuente en el género femenino); esto sugiere que los factores hormonales pueden estar involucrados (Scott, Wolfe *et al.* 2010, Tobon, Youinou *et al.* 2010).

#### **4.1.5 Etiología**

La AR se considera una enfermedad multifactorial, con una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales lo que desencadena la pérdida de la tolerancia inmunológica (McInnes and Schett 2011). Los agentes infecciosos se consideran posibles disparadores o desencadenantes; mientras que los factores socioeconómicos y el estilo de vida se asocian con el curso de la enfermedad (Scott, Wolfe *et al.* 2010, Tobon, Youinou *et al.* 2010).

##### **4.1.5.1 Factores del individuo**

###### **4.1.5.1.1 Factores genéticos**

De acuerdo con estudios en gemelos, se ha estimado que los factores genéticos colaboran en un 30 a 60% de riesgo, con una mayor influencia en el desarrollo de AR seropositiva (40% a 65%) que la AR seronegativa (20%). Sin embargo, aunque el contenido genético predispone, no es el determinante único, solamente contribuye al riesgo total. (Pratt, Isaacs *et al.* 2009, Smolen, Aletaha *et al.* 2016).

En estudios de asociación de genoma completo (GWAS, del inglés *Genome-Wide Association Study*) se han encontrado más de cien *loci* asociados con riesgo a AR, la mayoría involucrados en mecanismos inmunes, y otros que se comparten con otras enfermedades inflamatorias crónicas (Smolen, Aletaha *et al.* 2016) (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Genes asociados con la patogénesis de artritis reumatoide**

Gen	Función relevante para patogénesis de AR
<b>HLA</b>	Presentación antigénica y responsable de la selección de antígeno propio y repertorio de células T
<b>CD28</b>	Molécula coestimuladora para la activación de células T
<b>CTLA-4</b>	Supresor de la estimulación que regula las interacciones entre células T y la célula presentadora de antígeno
<b>PADI-4</b>	Enzima que convierte de arginina a citrulina
<b>PTPN22</b>	Involucrado en la regulación del umbral de activación de los linfocitos
<b>CD40</b>	Molécula coestimuladora que potencia las interacciones entre células T y B; aumentando la producción de anticuerpos
<b>IL-21</b>	Citocina que regula la diferenciación de células a Th17 y activación de células B
<b>KIR</b>	Regulan la activación de células NK y subpoblaciones de células T
<b>TNFRSF14</b>	Miembro de la superfamilia de receptor de TNF- $\alpha$ con actividad proinflamatoria
<b>TNFAIP3</b>	Señalización proteica y regulador negativo de TNF- $\alpha$ inducido por NF- $\kappa$ B
<b>TRAF1</b>	Regulador de la señalización de la de la superfamilia de receptor de TNF- $\alpha$

(McInnes and Schett 2011)

La región *HLA* (del inglés, *Human Leukocyte Antigen*) se destaca por presentar la más fuerte asociación genética con AR, particularmente el conjunto de alelos *HLA-DRB1*. Estos alelos comparten una secuencia de aminoácidos en común en el surco de unión al péptido de la cadena  $\beta$  del HLA-II, denominado epítoto compartido (SE; siglas del inglés, *Shared Epitope*) (Tobon, Youinou *et al.* 2010, McInnes and Schett 2011, Smolen, Aletaha *et al.* 2016).

Se estima que el SE confiere un tercio de susceptibilidad, donde el riesgo y la severidad de la enfermedad varía entre los alelos. Su asociación con AR no es directa, sino con la seropositividad a ACPA y FR, debido a que confiere una mayor afinidad del surco de unión a los péptidos citrulinados, lo que termina con la pérdida de tolerancia y permite la formación de autoanticuerpos (Scott, Wolfe *et al.* 2010, Tobon, Youinou *et al.* 2010, McInnes and Schett 2011, Smolen, Aletaha *et al.* 2016).

Otros genes asociados, que contribuyen en menor grado, son aquellos relacionados con vías de coestimulación (*CD28*, *CD40*), señalización de citocinas (*TNF- $\alpha$* ), activación del receptor del linfocito (*PTPN22*) e iniciadores de la activación de la respuesta innata (McInnes and Schett 2011, Smolen, Aletaha *et al.* 2016).

Varios estudios apuntan que el riesgo de los factores genéticos varía entre poblaciones. Polimorfismos en *PADI-4*, *CTLA-4* y *PTPN22* se han asociado como factores en poblaciones europeas, asiáticas y del occidente de México (Banos-Hernandez, Navarro-Zarza et al. 2017, Enciso-Vargas, Ruiz-Madrigal et al. 2017, Munoz-Valle, Padilla-Gutierrez et al. 2017, Smolen, Aletaha et al. 2018). La variabilidad de los factores genéticos también es diferente en los subgrupos de AR, en seronegativos a ACPA y FR se han identificado genes de riesgo a los asociados como alelos de *HLA* (*HLA-DRB1\*03*), factores reguladores de interferón y proteínas de unión a lectina (Kirino and Remmers 2015, Yarwood, Huizinga et al. 2016).

#### **4.1.5.1.2 Factores hormonales**

La prevalencia desigual de AR entre género, edad y además los efectos inmunomoduladores de las hormonas sexuales en la respuesta inmune, sugieren un papel de las hormonas dentro de la enfermedad (Tobon, Youinou et al. 2010, Tan, Peeva et al. 2015).

Algunos estudios han reportado que los cambios hormonales pueden influir en la susceptibilidad y severidad de la enfermedad; por ejemplo: una menarquia temprana, lactancia temprana, inicio de la menopausia y los niveles bajos de hormonas sexuales masculinas. En el caso del embarazo, se ha observado que durante el mismo, el riesgo a AR y la actividad de la enfermedad se reduce; sin embargo, después del parto, tanto el riesgo como la severidad aumentan (Islander, Jochems et al. 2011, Tan, Peeva et al. 2015).

#### **4.1.5.2 Factores ambientales**

El riesgo al desarrollo de AR puede ser influido por varios efectores, los factores ambientales pueden intervenir antes de que la enfermedad sea clínicamente aparente. El tabaquismo es el principal factor asociado, se ha demostrado que el riesgo a desarrollar AR en fumadores es 1.4 mayor que en no fumadores (Ruiz-Esquide and Sanmarti 2012, Pieringer and Studnicka-Benke 2013).

El efecto del tabaco se ha relacionado con seropositividad a ACPA y FR, severidad de la enfermedad y respuesta al tratamiento. Pese a que no está claro su papel con la evolución de la enfermedad, se ha observado su influencia en la aparición de manifestaciones extraarticulares, nódulos reumatoides y afecciones pulmonares (Ruiz-Esquide and Sanmarti 2012).



El tabaco, en conjunto con el SE, se ha asociado con niveles altos de ACPA debido a que influye en la eliminación de células necróticas, lo que predispone a la exposición de antígenos intracelulares y deriva en la activación de una respuesta inmune mediante la producción de anticuerpos (Ruiz-Esquide and Sanmarti 2012).

Otros factores que se han visto asociados a AR son los estresores bronquiales como aceites, sílice, *smog*; que al igual que el tabaco, promueven las modificaciones postraduccionales a través de PADI4, que da como resultado la alteración cuantitativa y cualitativa de las proteínas citrulinadas. Otros factores con menor impacto incluyen: el consumo de alcohol, café, bajos niveles de vitamina D, bajo nivel socioeconómico y el uso de anticonceptivos orales (Tobon, Youinou et al. 2010, Ruiz-Esquide and Sanmarti 2012).

#### 4.1.5.3 Factores infecciosos

El papel de los agentes infecciosos dentro de la etiología de AR es controversial, se consideran como agentes desencadenantes del inicio de la enfermedad en individuos que presentan una susceptibilidad genética, lo que genera un estímulo inespecífico al sistema inmune (Tobon, Youinou et al. 2010, McInnes and Schett 2011).

Varios estudios han reportado agentes infecciosos como *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Porphyromonas gingivalis*, parvovirus humano B19, citomegalovirus y virus del Epstein-Barr (EBV). Pese que se desconoce cómo desencadenan el inicio de la enfermedad se han propuesto mecanismos como el mimetismo molecular, donde las proteínas de algunos agentes, como EBV; y componentes del SE, están involucrados en la formación de inmunocomplejos durante la infección y desencadenar la inducción de FR (Scott, Wolfe et al. 2010, Smolen, Aletaha et al. 2016).

#### 4.1.6 Historia natural de la enfermedad

La evolución de la AR es variable, el inicio puede ser muy agudo con afecciones poliarticulares (más de 4 articulaciones) o subagudo con afección oligoarticular (2 a 4 articulaciones) o monoarticular con un curso aditivo que llega hasta la afección bilateral y simétrica en semanas o meses (Deane 2012).



La historia natural de la AR se desarrolla en 3 fases:

- **Fase preclínica**

Este periodo está comprendido por una fase de riesgo donde las interacciones entre factores ambientales, genéticos y endógenos (como edad y género) llevan al desarrollo de autoinmunidad, caracterizada por la presencia de auto-anticuerpos (FR y ACPA), que pueden estar presentes 9 años antes del diagnóstico de la enfermedad (Deane 2012).

- **Fase transitoria**

Entre fase preclínica y clínica, hay un periodo de transición que se caracteriza por la presencia de síntomas inespecíficos como: fatiga, anorexia y pérdida de peso (Marcos, Waimann et al. 2011). Es posible que presente marcadores específicos de la enfermedad (ACPA y FR), pero no existen síntomas o signos activos (Deane, Norris et al. 2010). Algunos estudios han observado niveles elevados de citocinas en suero (TNF- $\alpha$  e IL-12) o plasma de pacientes que anteceden a la aparición de las manifestaciones clínicas clásicas de la enfermedad.

- **Fase clínica**

Es la fase sintomática de la enfermedad, donde el paciente presenta las manifestaciones características y la aparición de numerosos biomarcadores autoinmunes e inflamatorios, además de daño en articulaciones (Deane, Norris et al. 2010). Pese que la duración de esta fase no ha sido bien definida se pueden diferenciar tres etapas:

- **AR muy temprana.** Comprende desde la aparición de los síntomas hasta aproximadamente los 3 meses de evolución, se caracteriza por manifestación de sinovitis como un proceso agudo y una artropatía que se manifiesta principalmente como oligoartritis
- **AR temprana.** Puede variar de 3 meses a 1 año de evolución. La sinovitis se convierte en un proceso crónico, donde la artropatía se manifiesta como oligoartritis o poliartritis.
- **AR establecida.** Se conoce a la AR con 1 año de evolución en adelante. A consecuencia de la sinovitis crónica, se da lugar a la formación del *pannus* lo que lleva a la destrucción progresiva e irreversible del cartílago y del hueso (Scott, Wolfe et al. 2010, Marcos, Waimann et al. 2011)

### 4.1.7 Inmunopatología de la artritis reumatoide

La inmunopatología de la AR involucra mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa (Scott, Wolfe *et al.* 2010, Smolen, Aletaha *et al.* 2016). La patología de la AR se puede dividir en 4 etapas: autoinmunidad preclínica, inicio de la sinovitis, formación de *pannus* y destrucción de la articulación (Yoshida and Tanaka 2014) (Figura 2).

#### 4.1.7.1 Autoinmunidad preclínica

El curso de la AR se caracteriza por un periodo de autoinmunidad preclínica que puede durar años. La interacción de factores genéticos y ambientales se han asociado con la formación y activación de linfocitos autorreactivos, lo que genera la producción de autoanticuerpos como FR y ACPA (Imboden 2009) (Figura 2).

La formación de células autorreactivas es consecuencia del fallo de los mecanismos de tolerancia central y periférica de los linfocitos T y B que permiten el escape de los linfocitos autorreactivos de su eliminación (McInnes and Schett 2011, Boissier, Semerano *et al.* 2012). La activación de linfocitos T autorreactivos se lleva a cabo mediante la presentación antigénica que promueve la diferenciación de la célula autorreactiva a Th1, productora de citocinas como: IL-2 e IFN- $\gamma$ . A su vez en centros germinales, los linfocitos T foliculares activados producen altas cantidades de IL-21 que promueve la maduración de células B con alta afinidad por el antígeno (después del proceso de maduración de la afinidad) a células plasmáticas productoras de anticuerpos (Klareskog, Malmstrom *et al.* 2011, McInnes and Schett 2011, Boissier, Semerano *et al.* 2012).

##### 4.1.7.1.1 Autoanticuerpos contra péptidos citrulinados

Los ACPA son un grupo de auto-anticuerpos dirigidos contra proteínas propias como: factor perinuclear, queratina, filagrina, fibrinogeno, fibronectina y vimentina. los cuales tienen en común la citrulina como determinante antigénico. La citrulina es generada durante varios procesos biológicos por una modificación postraduccional, conversión de arginina a citrulina, a través de la enzima peptidilarginina deaminasa (PADI), cuya actividad es mediada por la concentración de  $Ca^{+2}$  (Pratt, Isaacs *et al.* 2009, Klareskog, Malmstrom *et al.* 2011).

En AR, los ACPA presentan una alta especificidad (90-95%) y se encuentra en el 70-90% de los pacientes. Su producción es realizada por células plasmáticas en centros germinales formados en sinovia. Altos títulos de ACPAs se han asociado con una AR más erosiva lo que

sugiere un posible papel en la fisiopatología de la enfermedad (Pratt, Isaacs et al. 2009, Klareskog, Malmstrom et al. 2011, Kirino and Remmers 2015).

#### **4.1.7.1.2 Factor reumatoide**

El FR comprende una familia de autoanticuerpos, generalmente IgM, que reconocen la porción Fc de IgG, su producción se lleva a cabo en folículos linfoides y, en el caso de AR, en estructuras tipo centros germinales que se conforman en la sinovia. En individuos sanos, el FR (FR natural) es un anticuerpo IgM de baja afinidad que tiene como papel fisiológico potenciar la eliminación de complejos inmunes mediante el aumento de avidéz y tamaño del antígeno (Pratt, Isaacs et al. 2009, Kirino and Remmers 2015).

La presencia del FR se ha observado en enfermedades crónicas, así como en condiciones autoinmunes. En el caso de AR, en el 60-80% de los pacientes se ha detectado en altos títulos (>60 U/mL). A diferencia del FR natural, el FR en pacientes con AR presentan anticuerpos, además de IgM, IgG con una mayor afinidad debido al cambio de isotipo y la hipermutación somática en estructuras tipo centro germinales dentro sinovia lo que permite su escape de los mecanismos de tolerancia presentes dentro de los centros germinales convencionales (Pratt, Isaacs et al. 2009, Kirino and Remmers 2015).

#### **4.1.7.2 Inicio de la sinovitis**

La segunda etapa corresponde a la fase clínica de la historia natural de la enfermedad; aunque su inicio no se encuentra definido, es posible que agentes disparadores, como factores biomecánicos o infecciosos permitan la transición de la enfermedad hacia las articulaciones, que inicia con la inflamación de la membrana sinovial conocido como sinovitis (Boissier, Semerano et al. 2012, Smolen, Aletaha et al. 2016) (Figura 2).

En articulación, la interacción entre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y macrófagos ocasiona la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6). Estas promueven la angiogénesis sinovial, la permeabilización del tejido endotelial (mediada por la producción de VEGF) y la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1 y LFA-1), lo que conduce a la migración de leucocitos a la membrana sinovial. La infiltración, proliferación y acumulación de leucocitos en la membrana sinovial resulta en el desarrollo de sinovitis, la producción de metaloproteinasas de matriz (MMPs), la activación de condrocitos y osteoclastos (Scott, Wolfe et al. 2010, McInnes and Schett 2011, Yoshida and Tanaka 2014)

La infiltración celular está constituida por una variedad de células inmunes como: células NK (del inglés, *Natural Killer*), células dendríticas plasmacitoides (pDC), neutrófilos, entre otros. Dicho infiltrado celular participa mediante la producción de citocinas, quimiocinas y prostanglandinas; que finalmente resulta en una retroalimentación positiva y perpetuación de la inflamación en las articulaciones (Scott, Wolfe et al. 2010, McInnes and Schett 2011, Smolen, Aletaha et al. 2016).

#### **4.1.7.3 Formación de *pannus***

Los cambios en el microambiente articular ocasionan la reorganización de la arquitectura sinovial, el cambio de comportamiento de los residentes de la membrana sinovial (sinoviocitos) y la activación de fibroblastos. La alta proliferación de sinoviocitos, monocitos y fibroblastos ocasionan la hipertrofia de la membrana sinovial y como consecuencia el desarrollo de *pannus*, tejido inflamatorio de origen sinovial que recubre el cartílago articular en algunas artritis, caracterizado por su auto-perpetuación e invasión de tejidos vecinos como el cartílago (McInnes and Schett 2011, Smolen, Aletaha et al. 2016) (Figura 2).

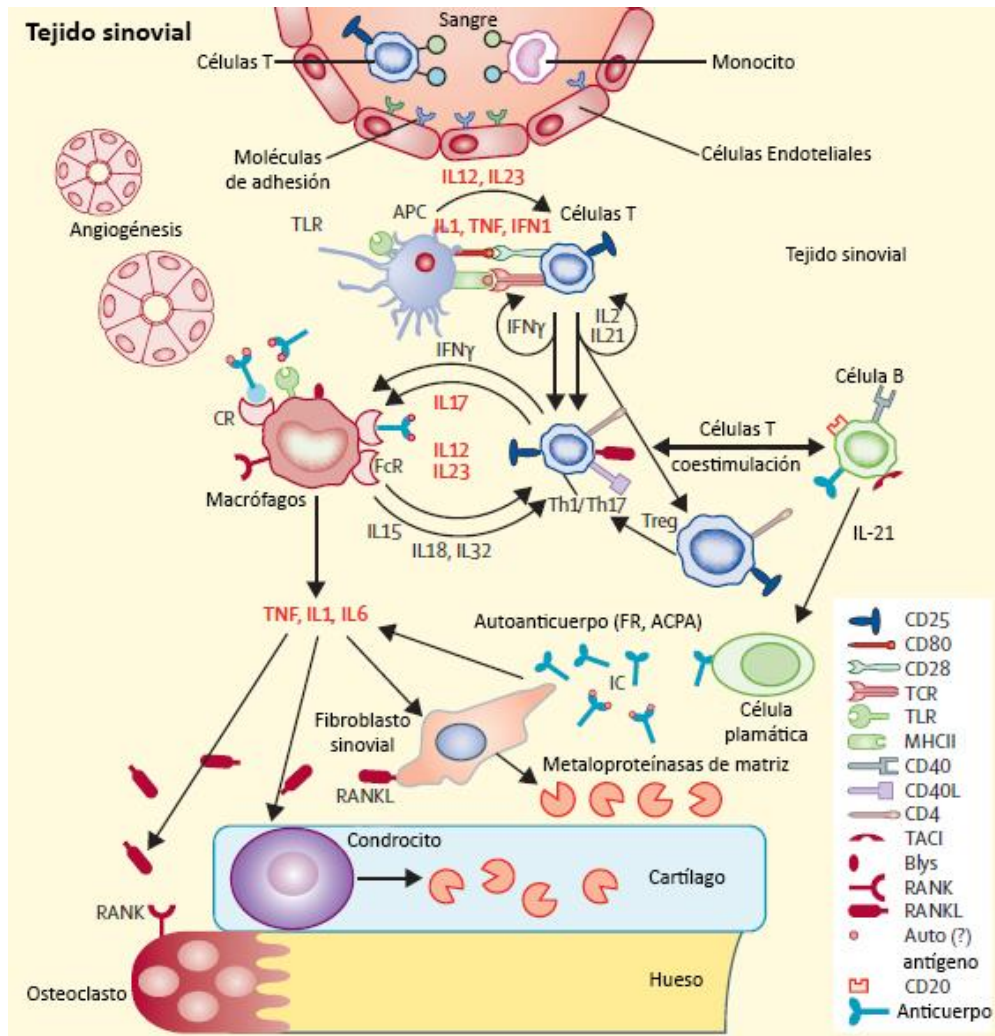
En etapas iniciales, los linfocitos Th1 son los que median la inflamación de la enfermedad e inducen la proliferación de fibroblastos y estimulan la hiperplasia sinovial. Sin embargo, en etapas más avanzadas, los linfocitos T se polarizan a Th17 debido al microambiente de citocinas (TGF- $\beta$ , IL-6 y IL-23) en articulación. Este microambiente, promueve activación de fibroblastos y condrocitos, que contribuyen en la retención de leucocitos en articulación, daño del cartílago y maduración de osteoclastos (Boissier, Semerano et al. 2012, Smolen, Aletaha et al. 2016).

#### **4.1.7.4 Destrucción de la articulación**

El daño articular es el resultado de la inflamación crónica, las afecciones al cartílago y hueso son mediados por vías patológicas diferentes (McInnes and Schett 2011).

La degradación de la matriz del cartílago es ocasionada por dos factores: el primero la pérdida de compuestos protectores, como lubricina y la alteración de síntesis de colágeno; y el segundo es la hiperplasia sinovial que favorece la invasión del cartílago y promueve la síntesis de MMP (metaloproteinasas de matriz) por los sinoviocitos tipo fibroblastos (Smolen, Aletaha et al. 2016).

Además de la prolongación y aumento de la inflamación, la activación de osteoclastos, que mediante su maquinaria enzimática ácida ocasiona la destrucción de tejidos, incluyendo cartílago y hueso subcondral (Boissier, Semerano et al. 2012).



**Figura 2. Inmunopatología de la artritis reumatoide**

El infiltrado celular lleva a la reorganización de la arquitectura sinovial; FLS que conlleva formación de *pannus* y producción de MMPs y citocinas proinflamatorias; que finalmente resulta en perpetuación de la inflamación en las articulaciones. (Smolen, Aletaha et al. 2018)

## 4.1.8 Valoración y Tratamiento de artritis reumatoide

### 4.1.8.1 Valoración clínica

La evolución de la AR es fluctuante, por lo tanto, la importancia del monitoreo obligatorio es un elemento clave para la aplicación de terapias eficientes y seguras (Scott, Wolfe et al. 2010, Robustillo Villarino and Rodriguez Moreno 2011).

Para la valoración clínica de pacientes con AR y la elección del tratamiento es necesario considerar los siguientes parámetros (Smolen, Landewe et al. 2014):

- Articulaciones inflamadas y dolorosas
- Determinaciones de laboratorio como velocidad de sedimentación de eritrocitos (VSG) y proteína C reactiva (pCr)
- Evaluación global de acuerdo al punto de vista paciente (EGP)
- El nivel de discapacidad del paciente
- Radiografía de manos, pies y otras articulaciones afectadas

El uso de índices compuestos permite resumir la información obtenida para evaluar la actividad de la enfermedad y dar un tratamiento de forma más objetiva. El índice más común es el Índice de Actividad de la Enfermedad (DAS por sus siglas en inglés, *Disease Activity Score*), del que se deriva una versión más simplificada, DAS28. El cálculo de DAS28 requiere de los siguientes elementos: número de articulaciones inflamadas y dolorosas (evaluando 28 articulaciones), marcador de inflamación (VSG o pCr) y el estado actual del paciente (Scott, Wolfe et al. 2010).

Los factores pronósticos (FP) son datos socio-demográficos, clínicos, analíticos y radiográficos. Estos se encuentran al inicio de la enfermedad y proporcionan información de la evolución del paciente lo cual sirven como guía en las decisiones terapéuticas (Robustillo Villarino and Rodriguez Moreno 2011). Los factores pronósticos se pueden clasificar en pronósticos funcionales, progresión radiológica y remisión de la enfermedad (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Clasificación de los factores pronóstico en artritis reumatoide**

	<b>Factor de mal pronóstico</b>
<b>Pronóstico funcional</b>	FR+, DAS28 elevado y HAQ-DI>1
<b>Progresión radiológica</b>	Género femenino, VSG y pCr alto; FR+, anti-CCP+, edema óseo y SE+
<b>Remisión de la enfermedad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Factores sociodemográficos:</b> Género femenino, fumadores activos y edad avanzada</li> <li>• <b>Factores dependientes de la enfermedad:</b> Etapa AR avanzada, DAS28 elevado, FR+, anti-CCP+, pCr&gt;20 mg/L, presencia de erosiones</li> </ul>

(Robustillo Villarino and Rodriguez Moreno 2011)



---

#### 4.1.8.2 Tratamiento

El tratamiento de AR consiste en el uso de fármacos inmunosupresores que tienen como objetivo reducir o inhibir la respuesta inmune mediante el arresto de las rutas de activación, diferenciación celular e inducción de muerte celular. En general, los fármacos utilizados carecen de una acción clono-específica, con excepción de los anticuerpos monoclonales (Blanco, Ballina et al. 2011).

Pese a que el tratamiento de la AR no logra una completa curación, el esquema terapéutico se centra en la disminución de la actividad de la enfermedad o remisión del paciente, para minimizar la posibilidad de lesión articular, aliviar el dolor, mantener la funcionalidad y calidad de vida del paciente. En general, el tratamiento consiste de una terapia de 3 tipos de fármacos: fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs; del inglés, *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*), Glucocorticoides y Drogas Antirreumáticas Modificadoras de la Enfermedad (DMARDs; del inglés, *Disease Modifying Anti-Reumatic Drugs*) (Umicevic Mirkov and Coenen 2013).

El objetivo de cada fármaco es variado, los NSAIDs reducen el dolor, rigidez y mejoran la función articular, no interfieren con el daño en articulación y por lo tanto no modifica la enfermedad. Los DMARDs tienen como blanco la inflamación y reducir el daño progresivo estructural (Blanco, Ballina et al. 2011).

##### 4.1.8.2.1 Drogas Antirreumáticas Modificadoras de la Enfermedad

Los DMARDs se caracterizan por interferir en el proceso de la enfermedad, por lo tanto, reducen o revierten los signos y síntomas, la discapacidad, deterioro en la calidad de vida y el daño en articulaciones (Scott, Wolfe et al. 2010).

Los criterios utilizados para considerar un medicamento como DMARD son los siguientes:

- ▶ Inicio de acción lenta
- ▶ Efecto sobre los reactantes de fase aguda
- ▶ Mejoría en la funcionalidad

Los DMARDs se pueden clasificar en dos clases: los sintéticos (sDMARDs) y los agentes biológicos (bDMARDs) (Cuadro 5). Los sDMARDs, suprimen la respuesta autoinmune de forma generalizada, se dividen como convencionales (csDMARDs, cs: del inglés,

*conventional synthetic*), que incluye metotrexate (MTX), sulfasalazina (SSZ) y leflunomida (LEF); y *sDMARDs* dirigidos, como tofacitinib (*tsDMARDs*, ts: del inglés, *target synthetic*) (Scott, Wolfe et al. 2010).

Los *bDMARDs* consisten en anticuerpos monoclonales que tienen como blanco componentes de la cascada inflamatoria, esto incluye: inhibidores de TNF, inhibidores de coestimuladores de linfocitos T, agentes anti-linfocitos B y bloqueadores del receptor IL-6, así como inhibidores IL-1 (Scott, Wolfe et al. 2010).

**Cuadro 5. Drogas modificadoras de la enfermedad y sus efectos celulares**

Efecto en la célula	
<i>Drogas Modificadoras de la enfermedad sintéticas (sDMARDs)</i>	
<b>Metotrexate</b>	Reprime las respuestas inflamatorias; induce la apoptosis de linfocitos T y B activos efectores y memoria, produce efectos antiinflamatorios e inhibe la fagocitosis.
<b>Sulfasalazina</b>	Altera la función de los neutrófilos, células y NK; además inhibe la producción IL-2, inhibe proliferación de fibroblastos y reduce la formación de metaloproteinasas y citocinas.
<b>Leflunomida</b>	Altas concentraciones modulan la transcripción del factor NFκB, disminuye la expresión de receptores de factores de crecimiento, de IL-2 y 6, metaloproteinasas y aumenta en la síntesis de TGF-β
<b>Hidroxicloroquina y cloroquina</b>	Causa alteraciones funcionales en células fagocíticas y macrófagos; altera la presentación de autoantígenos, disminuye la inflamación e inhibe la actividad de las NK y la producción de IL-2 en Linfocitos T.
<i>Drogas Modificadoras de la enfermedad biológicas (bDMARDs)</i>	
<b>Inhibidores TNF</b>	Inmunoglobulinas con alta afinidad a TNFα, impide la unión a su receptor y permite la lisis celular que lo expresan en la membrana (etanercept, adalimumab y infliximab).
<b>Inhibidores de coestimuladores de T</b>	Reduce la respuesta inflamatoria inmune tipo celular, modula de forma selectiva la segunda señal de estimulación que es necesaria para que los linfocitos que expresan el marcador molecular CD28 estén completamente activados (abatacept).
<b>Agentes anti-B</b>	Anticuerpos anti-CD20, la molécula CD-20 se expresa en los linfocitos pre-B y LB maduros, regula los primeros pasos de la activación del ciclo celular y diferenciación (rituximab).
<b>Bloqueadores de receptor de IL</b>	Antagonistas de la IL-1 e IL-6; citocinas que poseen efectos inflamatorios y son producidos por monocitos, macrófagos y algunas células sinoviales (anakinra).

(Scott, Wolfe et al. 2010)

**4.1.8.3 Elección y valoración del tratamiento**

La elección del tratamiento dependerá de los datos obtenidos de la valoración inicial, como el grado de severidad y la presencia de los factores pronóstico. Una evaluación integral y frecuente permite valorar el grado de progresión que presenta la enfermedad, predecir un



pronóstico y en consecuencia indicar el programa terapéutico más adecuado. Debido a la variabilidad de la evolución no se puede detallar un mismo esquema terapéutico para todos los pacientes, por lo que dependerá del curso clínico y situaciones concretas que se presentan durante el transcurso de la AR (Scott, Wolfe et al. 2010, Smolen, Landewe et al. 2014).

En 2014, el ACR y la EULAR publicaron una guía para el tratamiento de artritis reumatoide, que consiste en 14 recomendaciones acerca de aspectos generales como la obtención de remisión o baja actividad de la enfermedad usando un enfoque de tratamiento dirigido y las estrategias recomendadas para el tratamiento de la AR con *DMARDs* mediante el desarrollo de un algoritmo basado en dichas recomendaciones (Smolen, Landewe et al. 2014)

El objetivo del tratamiento es la remisión del paciente, es decir la ausencia de la actividad de la enfermedad en los pacientes o en su defecto, una actividad baja de la enfermedad ( $DAS28 < 2.4$ ) a los 6 meses del inicio del tratamiento, con una valoración del progreso a los 3 meses para el ajuste o cambio de terapia en caso de que no presente respuesta positiva (no respondedor) (Smolen, Landewe et al. 2014).

Actualmente las terapias para la AR presentan una eficiencia variable que finalmente puede resultar en una respuesta positiva, parcial y nula al tratamiento. La predicción de la respuesta ha sido uno de los retos más complicados en el manejo de la AR, ya que evitaría el uso prolongado de fármacos tóxicos y un mejor control de la enfermedad, crucial para la prevención de daño estructural. Sin embargo, hasta la fecha hay pocos marcadores confiables para el uso en la clínica (Romao, Canhao et al. 2013, Umicevic Mirkov and Coenen 2013).

Mientras los predictores de mal pronóstico se encuentran bien establecidos, no son precisos al relacionarlo con la respuesta al tratamiento. Además, la respuesta al tratamiento, es el resultado de la interacción de múltiples factores que se pueden dividir en 4 categorías: aspectos del paciente (como el sexo y tabaquismo), aspectos de la enfermedad (duración de la enfermedad y presencia de anticuerpos), tratamiento (virgen a tratamiento) y factores genéticos (*SE*, *RFC1* y *KIR*) (Cuadro 6) (Romao, Canhao et al. 2013, Umicevic Mirkov and Coenen 2013).

**Cuadro 6. Predictores de respuesta a metotrexate y otros DMARDs**

Factor	Predictor a respuesta	Descripción
Género	Hombres (buena respuesta a MTX)	Óptima respuesta en AR temprana y establecida
Tabaquismo	Fumadores activos (mala respuesta a MTX)	Se desconoce su efecto en otros DMARDs
Duración de la enfermedad	AR temprana (buena respuesta a DMARDs)	La AR temprana tiene mejor respuesta que la AR establecida
SE	SE+ (mala respuesta a MTX)	Se desconoce su influencia en la respuesta a otros DMARDs
RFC1	SNP 80G>A (buena respuesta a MTX)	Se desconoce su influencia en la respuesta a otros DMARDs

SE: del inglés, *Shared epitope*; RFC1: del inglés, *Replicate Factor C1*. (Romao, Canhao et al. 2013)

#### 4.1.9 Poblaciones celulares involucradas con AR

La AR se caracteriza por ser inflamatoria articular, sistémica y crónica. Pese a que todavía los mecanismos inmunopatológicos precisos no se encuentran completamente definidos, este proceso es conducido por la respuesta inmune innata y la adaptativa. Por lo tanto, existe la participación de diferentes poblaciones en el microambiente articular como: células T, células B, macrófagos, neutrófilos y sinoviocitos tipo fibroblastos que finalmente ocasionan la destrucción de cartílago y hueso (Scott, Steer et al. 2011).

Dentro la inmunopatología de AR se ha observado la participación de células NK y subpoblaciones de linfocitos T. Ambas poblaciones presentan un conjunto de receptores activadores e inhibidores que finalmente controlan su activación; entre estos receptores se encuentra la familia de receptores tipo inmunoglobulina de células NK (KIR; del inglés, *Killer-cell immunoglobulin-like receptor*) (Kulkarni, Martin et al. 2008).

##### 4.1.9.1 Células NK en artritis reumatoide

Las células NK son células grandes, granulares que constituyen del 5 al 10% de los linfocitos circulantes en sangre periférica y 5% en tejido linfoide. Contribuyen a la defensa contra infecciones mediante la capacidad de lisar células blanco y producción de una amplia variedad de citocinas que permite a su vez regular las respuestas inmunes adaptativas (Ahern and Brennan 2011, Poggi and Zocchi 2014).

A diferencia de otros linfocitos, las células NK presentan una línea germinal de receptores definida y limitada, que le permite dar respuesta a un amplio rango de estímulos. Tanto la

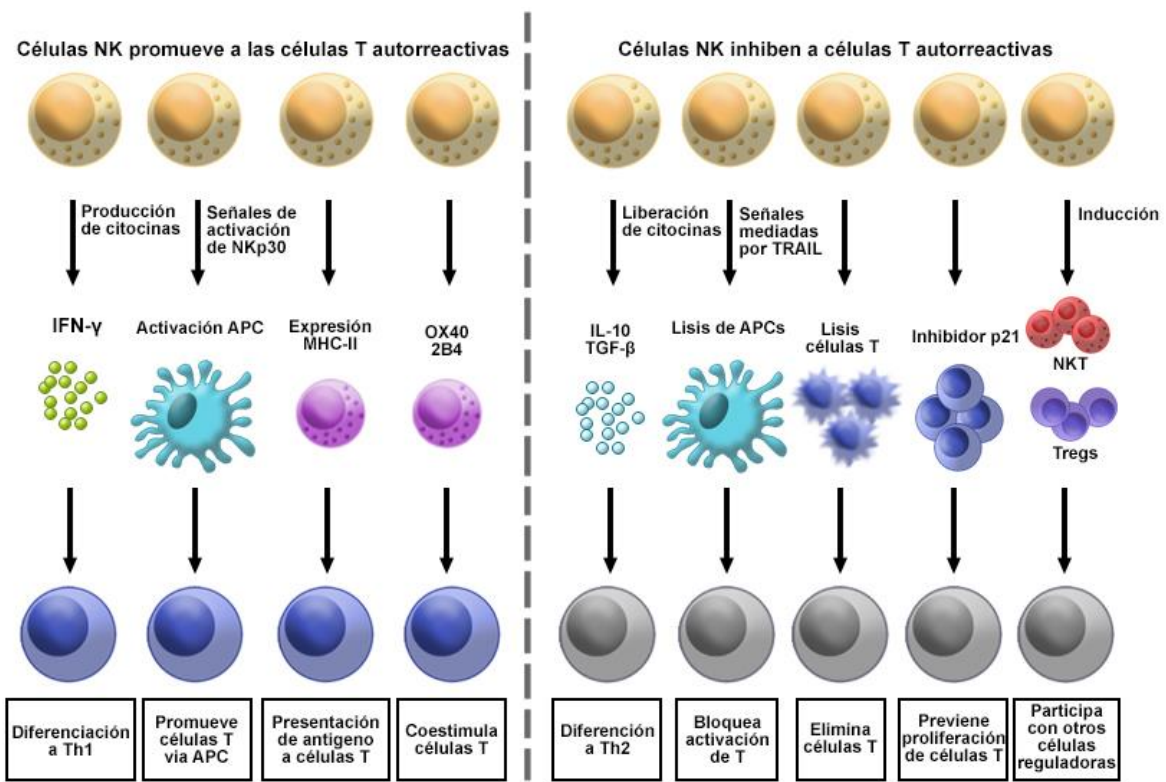
activación como la función de las células NK están reguladas por un balance de señales mediada por su repertorio de receptores como: TRAIL, CD16, NKG2(A, C y D) y KIR, entre otros (Shi and Van Kaer 2006, Poggi and Zocchi 2014).

La población celular NK se caracteriza por ser heterogénea, esta se puede clasificar de acuerdo al fenotipo de receptores, perfil de citocinas y su citotoxicidad. Las células NK humanas se pueden caracterizar por la expresión de CD56 y se distinguen dos subpoblaciones: CD56<sup>dim</sup> (baja expresión de CD56) y CD56<sup>bright</sup> (alta expresión de CD56) (Crome, Lang et al. 2013).

Las poblaciones CD56<sup>dim</sup> presentan una mayor cantidad de gránulos con perforinas y granzimas lo que le atribuye una mayor actividad citotóxica, comparado con CD56<sup>bright</sup>. Una alta expresión de CD16 en su superficie aumenta la eficiencia de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC; del inglés, *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*). Por otro lado, las células CD56<sup>bright</sup> son esencialmente productoras de citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-10 e IL-13) (Shi and Van Kaer 2006, Ahern and Brennan 2011).

A su vez, las poblaciones de células NK pueden diferir de acuerdo a su localización, las células NK que se localizan en los tejidos linfáticos secundarios difieren de las NK en circulación. Aquellas localizadas en tejido linfático, son preferentemente CD56<sup>bright</sup>, por lo general activadas por células dendríticas y secretan grandes cantidades de citocinas que estimulan la respuesta inmune a través de la activación de las células T. Mientras las células NK periféricas son principalmente CD56<sup>dim</sup>, con alta expresión de CD16 y potencial citotóxico (Ahern and Brennan 2011, Poggi and Zocchi 2014, Popko and Gorska 2015).

En enfermedades autoinmunes, las células NK juegan un papel activo debido a que sus funciones permiten modular las respuestas de células T y limitar la magnitud del daño causado por la inflamación y el tejido diana. Por lo que esta población celular puede tanto promover como prevenir el inicio y progreso de las patologías autoinmunes (Figura 3) (Shi and Zhou 2011, Popko and Gorska 2015).



**Figura 3. Interacción entre las células NK y T autorreactivas.**  
Efectos de la interacción de células NK y células T autorreactivas. Modificado de (Shi and Zhou 2011)

La importancia de limitar el daño causado por la respuesta inmune al tejido radica en evitar un ataque exacerbado que puede resultar en la destrucción de células diana y la liberación de autoantígenos, que aunado a la secreción de citocinas como IFN- $\gamma$ , puede activar macrófagos y direccionar a una respuesta tipo Th1 (Figura 3) (Shi and Zhou 2011, Popko and Gorska 2015).

Los mecanismos por los que las células NK promueven la formación de células T autorreactivas, incluyen: la activación recíproca entre células dendríticas y NK a través de la producción de citocinas y por interacciones coestimuladoras (señales de activación NKp30); la inducción de la expresión de moléculas coestimuladoras como OX40 o 2B4 en APC; la activación directa de las células T mediante la expresión de MHC-II y facilitar la diferenciación de las células T *naïve* a Th1 (Shi and Zhou 2011, Popko and Gorska 2015).

Por otro lado, las células NK presentan diferentes mecanismos para inhibir o suprimir la formación y respuestas de T autorreactivas como: la polarización a Th2, previene la proliferación de células T mediante p21, la eliminación por interacción directa de APCs y

células T autorreactivas, colabora en conjunto con T reguladoras y células NKT para suprimir funciones de células T y B (Figura 3) (Shi and Zhou 2011, Popko and Gorska 2015).

Varios estudios han reportado que, en condiciones autoinmunes, el fenotipo y función de las poblaciones de células NK se encuentran alteradas. En la mayoría de los casos, la población se encuentra reducida y con una comprometida capacidad citotóxica, dicho fenómeno se denomina degeneración de las células NK. Este fenómeno afecta a otras células como las T reguladoras (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) y NKT con restricción a CD1d. Dicho esto, es posible que la degeneración de estas poblaciones celulares sea un medio por el cual las células T autorreactivas puedan controlar el proceso autoinmune (Shi and Van Kaer 2006, Shi and Zhou 2011, Popko and Gorska 2015).

En AR, se ha sugerido que existe una alteración en la frecuencia y función de las poblaciones de NK en periferia y en articulación, esto al mismo tiempo se ha relacionado con el aumento de la actividad de la enfermedad (Shi and Zhou 2011, Popko and Gorska 2015).

En articulación de pacientes con AR, se ha reportado que las células NK sinoviales presentan un fenotipo único comparado con NK de otros tejidos, la mayoría son CD56<sup>bright</sup> (60%), con una alta expresión de receptores como NKG2A y una disminución de expresión de KIR y CD16, además de la alta producción de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-22 y TNF- $\alpha$ ). Su activación se puede derivar de la expresión anormal de MHC-I en sinoviocitos (Ahern and Brennan 2011, Poggi and Zocchi 2014).

Las células NK sinoviales modulan la progresión de la AR mediante la producción de citocinas, en conjunto con los linfocitos T, B y macrófagos, lo que promueve el reclutamiento de leucocitos a sinovia, estimula la maduración de células dendríticas y cambio de isotipo en linfocitos B, además de promover la proliferación de fibroblastos sinoviales (Ahern and Brennan 2011, Popko and Gorska 2015).

En contraste con las células NK sinoviales, en periferia la población de NK presenta un efecto negativo. La frecuencia y la actividad citotóxica de la subpoblación NK CD56<sup>dim</sup> periféricas de pacientes con AR muestran una menor actividad citotóxica con respecto a las NK de personas sanas, lo que se ha relacionado con progresión y severidad de la enfermedad (Shi and Zhou 2011, Poggi and Zocchi 2014).

#### 4.1.9.2 Células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en artritis reumatoide

Los linfocitos CD4<sup>+</sup> son considerados los orquestadores de la respuesta inmune adaptativa celular que pueden formar subtipos con fenotipos específicos y diferente producción de citocinas que permiten una respuesta eficiente contra una variedad de respuesta a diferentes clases de patógenos. Dentro de las subpoblaciones, las células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> (CD28<sup>-</sup>) son un subtipo celular único derivadas de células Th1, caracterizada por la falta de CD28 y que recientemente se ha relacionado como catalizador de inflamación en varios desordenes inflamatorios. En contraste con las células Th convencionales, presentan características y funciones únicas las cuales se describen en el cuadro 7 (Dumitriu 2015, Maly and Schirmer 2015).

**Cuadro 7. Biología de las poblaciones T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> y CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>**

	Células T CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>null</sup>	Células T CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>
Receptor coestimulador CD28	Ausente	Presente
Receptor coestimulador OX40/4-1BB	Incrementada	Ausente <sup>1</sup>
Receptor de células T (TCR)	Oligoclonal	Policlonal
Receptores de células NK	Presente	Ausente
CX3CR1	Presente	Ausente
Citocinas características	IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$	Variable <sup>2</sup>
Enzimas citolíticas	Presente	Ausente
Función citotóxica	Si	No
Resistencia a inducción de apoptosis	Si	No
Habilidad de dar señales a células B	No	Si
Sensibilidad a supresión por T reguladoras	Disminuida	Si

<sup>1</sup> La expresión de Ox40 y 4-1BB es inducida después de la activación de las células T

<sup>2</sup> La expresión de citocinas depende de la subpoblación de Th

(Dumitriu 2015)

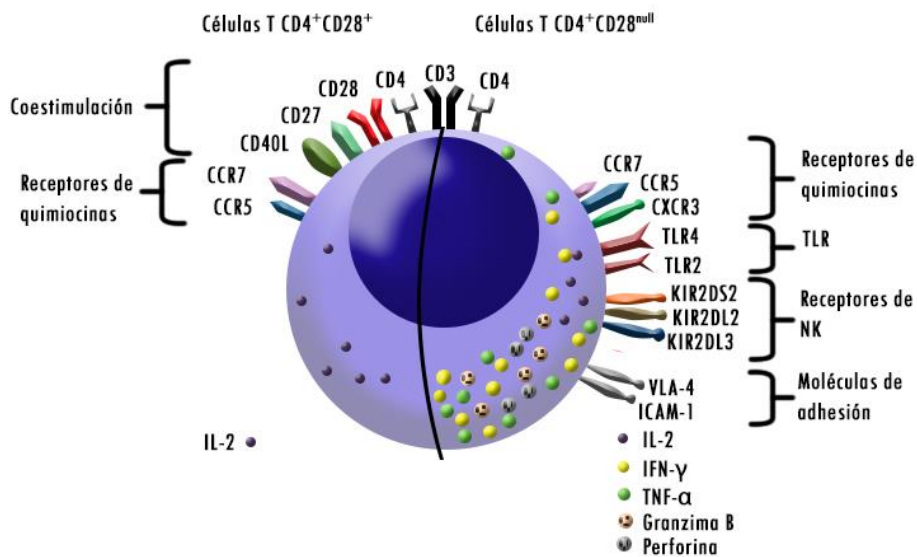
La principal característica de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> es la falta de expresión de CD28, receptor coestimulador esencial para la activación, proliferación y supervivencia de los linfocitos T. La pérdida de expresión de CD28 ocurre a nivel transcripcional, donde hay una inhibición del complejo de unión a la región promotora (motivo  $\alpha\beta$ ) (Maly and Schirmer 2015). Pese a que el mecanismo por el cual ocurre la pérdida de CD28 es desconocida, se ha observado que es un proceso reversible donde las citocinas pueden estar involucradas tanto con su pérdida como en la reexpresión del receptor. Los altos niveles de TNF- $\alpha$  se han asociado con la disminución de CD28 en superficie; mientras que IL-12 se ha observado que



lleva a la reexpresión de CD28 en esta población (Rammos and Kondomerkos 2007, van Bergen and Koning 2010).

El receptor de células T (TCR) de esta población se caracteriza por presentar una diversidad limitada en sangre periférica y forma poblaciones oligoclonales, resultado de la exposición repetitiva al mismo antígeno endógeno o exógena. Se ha sugerido que los factores que influyen en la oligoclonalidad del TCR varían entre enfermedades inflamatorias crónicas y virales. En el síndrome coronario agudo, se ha relacionado el HSP-60 como el factor responsable de la activación permanente, esto en conjunto con KIR2DS2 se ha observado que pueden inducir al fenotipo citotóxico de esta población (van Bergen and Koning 2010, Dumitriu 2015, Maly and Schirmer 2015).

Además de la pérdida de CD28, estas células T CD4<sup>+</sup> proinflamatorias se caracterizan por su habilidad de secreción de citocinas, principalmente IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ; la presencia de gránulos funcionales de perforinas y granzimas B; y la capacidad de expresar receptores de células NK como: NKG2D, CD11b, CD65, CD161, TLR2/4 y KIR. En enfermedades como AR, poliangeitis granulomatosa y diabetes mellitus tipo 1 dependiente de insulina se ha detectado poblaciones CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> que expresan receptores NKG2A y KIR. El papel de KIR en esta población todavía es desconocido; más se ha confirmado que los receptores activadores ejercen una función coestimuladora (Maly and Schirmer 2015) (Figura 4).



**Figura 4. Receptores expresados en células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>**  
 Perfil de receptores, citocinas y quimiocinas producidos por células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> (Maly and Schirmer 2015)

La frecuencia de esta población es baja en individuos sanos, pero aumenta conforme a la edad. En individuos jóvenes el porcentaje es de 0.1 - 2.5% del total de linfocitos T CD4+, mientras en individuos sanos mayores de 65 años se acumula hasta 50% de los linfocitos CD4+ totales esto indica su influencia en la senescencia del sistema inmune (Dumitriu 2015, Maly and Schirmer 2015). También se ha encontrado una alta prevalencia de esta población en enfermedades inflamatoria crónicas, inmunodeficiencias y en algunas infecciones. Por lo que esta población puede ser considerada como marcador de senescencia temprana en condiciones patológicas (Dumitriu 2015, Maly and Schirmer 2015).

Es importante destacar que las características funcionales y fenotípicas de esta población pueden variar dependiendo de la patología y la actividad de la enfermedad, lo que sugiere que pueden estar involucrados con la patogénesis de desórdenes crónico inflamatorios (van Bergen and Koning 2010, Dumitriu 2015). En AR, esta población aparece en un tercio de los pacientes y con mayor frecuencia en sangre periférica que en articulación. En ambos tejidos, se sugiere que esta población celular realiza diferentes funciones: en articulación se ha observado que puede producir altas concentraciones de IL-17 y TNF- $\alpha$ ; mientras en sangre periférica se especula que participa en la afección en otros tejidos. Hasta el momento esta población se encuentra directamente asociada con la severidad y con el desarrollo de manifestaciones extraarticulares como la formación de nódulos subcutáneos y vasculitis (Dumitriu 2015, Maly and Schirmer 2015).

## 4.2 Receptores tipo inmunoglobulina de las células NK

### 4.2.1 Estructura genética de KIR

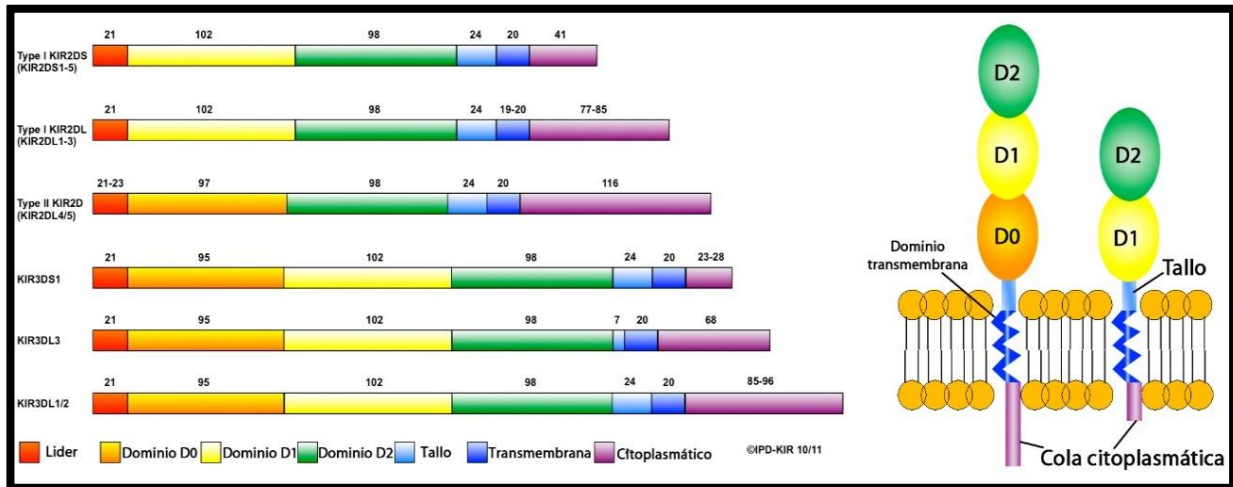
Los KIR son miembros de la superfamilia de receptores tipo inmunoglobulina y están codificados en el cromosoma 19q13.4, en el clúster de receptor leucocitario (LCR). La familia génica *KIR* está compuesta de 17 genes: 14 que codifican para receptores, 7 inhibidores (*KIR2DL1*, *2DL2*, *2DL3*, *3DL1*, *3DL2*, *3DL3* y *2DL5*), 6 activadores (*2DS1*, *2DS2*, *2DS3*, *2DS4*, *2DS5* and *3DS1*) y un receptor tanto activador como inhibidor (*KIR2DL4*); 2 son pseudogenes y 1 gen ancestral (Williams, Bateman et al. 2005, Kulkarni, Martin et al. 2008, Ivarsson, Michaelsson et al. 2014)

La familia de genes *KIR* se caracteriza por ser altamente polimórfica. Cada *KIR* puede tener entre 4 o más alelos; asimismo, un individuo puede presentar desde 9 a 17 genes, que



pueden estar en diferentes combinaciones, lo que genera una enorme diversidad haplotípica. Esta diversidad ha sido generada por una serie de recombinaciones y entrecruzamientos desiguales durante la meiosis, que ocasiona contracciones y expansiones a lo largo de la región (Williams, Bateman et al. 2005, Torres-García, Barquera et al. 2008)

La estructura génica de *KIR* consiste de regiones promotoras independientes localizadas hasta 500 pares de bases antes del primer codón de la transcripción. Su estructura génica básica consiste de una secuencia señal, un exón para cada dominio tipo inmunoglobulina (D0, D1 y D2), tallo y región transmembrana; y por último el exón final corresponde a la región citoplasmática, su tamaño varía dependiendo si es activador o inhibidor (Figura 5) (Williams, Bateman et al. 2005).



**Figura 5. Estructura génica y proteica de *KIR*.**

La estructura génica básica de *KIR* consiste de una secuencia señal, un exón para cada dominio tipo inmunoglobulina (D0, D1 y D2), tallo y región transmembrana; y por último el exón final corresponde a la región citoplasmática. (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/introduction.html>, 2016)

#### 4.2.2 Receptores KIR

Los receptores KIR (CD158) están constituidos por dos a tres dominios extracelulares tipo inmunoglobulina y una cola citoplasmática, donde los receptores activadores presentan cola corta y el receptor inhibidor presenta cola larga; con excepción del receptor KIR2DL4 que tiene una cola larga y presenta ambas funciones (Williams, Bateman et al. 2005).

La nomenclatura de los receptores es de acuerdo a sus características estructurales, el número de dominios tipo inmunoglobulina (2D o 3D), el tamaño de la cola citoplasmática (L, largo y S, corto) y un dígito que indica el orden conforme fueron descubiertos. Los receptores

inhibidores presentan una cola citoplasmática que contienen motivos inhibidores (ITIMs) que mediante el reclutamiento de SHP1 y SHP2 inhiben la actividad de las células NK. Los KIR con cola citoplasmática corta activan a las células NK por la molécula adaptadora DAP12 que presenta motivos activadores basados en tirosina (ITAMs) (Williams, Bateman et al. 2005, Kulkarni, Martin et al. 2008).

Los ligandos de los receptores KIR son las moléculas de HLA-I que se encuentran codificados en el cromosoma 6. La segregación de ambas familias de genes es independiente, es decir, que la ausencia/presencia de los ligandos *HLA* específico de algún KIR puede afectar la funcionalidad del receptor (Williams, Bateman et al. 2005, Kulkarni, Martin et al. 2008, Carrillo-Bustamante, Kesmir et al. 2016).

Hasta la fecha, se han identificado la mayoría de los ligandos de los receptores KIR inhibidores. En el caso de los KIR activadores, la mayoría de sus ligandos son desconocidos; sin embargo, algunos KIR activadores (KIR2DS2, KIR2DS1) dado a su parecido con su contraparte inhibidora, reconocen HLA-I, aunque con una menor afinidad (Cuadro 8) (Ivarsson, Michaelsson et al. 2014, Carrillo-Bustamante, Kesmir et al. 2016).

**Cuadro 8. Ligando de los receptores KIR**

Receptor	Linaje*	Ligando
<i>KIR activadores</i>		
2DS1 (CD158h)	III	HLA-C2
2DS2 (CD158j)	III	HLA-C1, HLA-A*11:01
2DS3	III	Desconocido
2DS4 (CD158i)	III	HLA-C*05:01, HLA-C*16:01, HLA-A*11:02
2DS5 (CD158g)	III	Desconocido
3DS1 (CD158e)	II	Desconocido
<i>KIR inhibidores</i>		
2DL1 (CD158a)	III	HLA-C2
2DL2 / 2DL3 (CD158b)	III	HLA-C1, HLA-C2, HLA-B*46:01 y HLA-B*73:01
2DL4 (CD158d)	I	HLA-G (posible interacción intracelular)
2DL5 (CD158f)	I	Desconocido
3DL1 (CD158e)	II	HLA-A con motivo Bw4, HLA-Bw4
3DL2 (CD158k)	II	HLA-A3/A11
3DL3	V	Desconocido

\*Los primates comparten 4 linajes filogenéticos que se caracterizan por su estructura y especificidad por MHC-I. En humanos, el linaje I: receptores KIR que se unen al complejo HLA-G-péptido. Linaje II: receptores KIR que reconocen epítipo A3/A11 en HLA-A y Bw4 en HLA-A y B. Linaje III: receptores KIR que se unen a HLA-C C1/C2. Linaje V: receptores KIR que no se conoce su ligando (Carrillo-Bustamante, Kesmir et al. 2016)

La afinidad y especificidad de las interacciones KIR-HLA dependen principalmente de la variabilidad en los alelos de *KIR* o por antagonismo del péptido unido al HLA; en consecuencia, la unión de sitio del reconocimiento del ligando puede variar, lo que provoca la activación e inhibición en diferente intensidad, e inclusive puede impedir su expresión funcional. por lo tanto, la variedad de genotipos *KIR/HLA* se relaciona con la patogénesis y protección a infecciones virales, autoinmunes, desordenes inflamatorios y cáncer (Williams, Bateman et al. 2005).

### 4.2.3 Expresión de KIR y citocinas

Los receptores KIR se expresan en células NK y en algunas poblaciones de células T. Sin embargo, pese a que ambas poblaciones presenten similitudes fenotípicas y funcionales, los mecanismos de regulación de la expresión, selección y función de KIR son diferentes en ambas poblaciones. En el cuadro 9 se muestran las diferencias de la expresión de KIR en ambas poblaciones celulares (Torres-García, Barquera et al. 2008, van Bergen and Koning 2010).

**Cuadro 9. Expresión de receptores KIR en células NK y T**

		Células NK	Células T
<b>Regulación</b>	Metilación del promotor	Estocástico	Gradual
	Tamaño del promotor	120-250 pb	60 pb
	Factores transcripcionales	YY1, CRE/ATF, RUNX3, Sp1	YY1, CRE/ATF
<b>Repertorio</b>	KIR2DL1/2DS1	15%	CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>null</sup> : 0%
	KIR2DL2/L3/S2	30%	CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>null</sup> : sobreexpresados
	KIR2DL4	100%	<100%
<b>Tolerancia</b>	Licenciamiento	Si	No
	Al menos uno	No	No
<b>Función</b>	KIR inhibidores	Inhibición	Inhibición
	KIR activadores	Activación	Coestimulación

(van Bergen and Koning 2010)

En el caso de las células NK, la expresión de KIR ocurre de forma aleatoria, donde el número puede variar de 3 a 5 receptores por célula, y los receptores expresados dependerán del genotipo del individuo. Esto genera un diverso repertorio de receptores que es regulado por la presencia de su ligando correspondiente (Cuadro 8), lo que se refleja en la intensidad de la respuesta. En general, es necesario un balance de la combinación de receptores para una

óptima respuesta durante una amenaza patógena mientras se mantiene la autotolerancia (van Bergen and Koning 2010).

En células T, los KIR se expresan en linfocitos T de memoria, efectores de memoria y  $CD4^+CD28^{null}$ . Al igual que en NK, cada célula T puede tener patrones distintos de expresión de KIR, aunque se ha observado que KIR2DL2, 2DL3 y 2DS2 están sobreexpresados en  $CD4^+CD28^{null}$  (van Bergen and Koning 2010, Rajalingam 2012).

La regulación de la expresión de KIR en NK y células T difiere tanto en las modificaciones epigenéticas como en factores de transcripción. En NK, la metilación/desmetilación de las islas CpG en las regiones proximales de los promotores KIR regula la transcripción del gen, el cual es un proceso de todo o nada. En las células T, la desmetilación es de forma gradual y se incrementa conforme ocurren los progresos de diferenciación a T memoria (van Bergen and Koning 2010).

Como previamente fue mencionado el genotipo HLA presenta un impacto sobre la funcionalidad e intensidad de la combinación de receptores expresados. Las células NK que no expresan receptores inhibidores no son eliminadas, sino que presentan una hiporrespuesta, lo que es considerado el mecanismo de tolerancia para NKs, proceso denominado licenciamiento (Williams, Bateman et al. 2005, Torres-García, Barquera et al. 2008, van Bergen and Koning 2010, Rajalingam 2012).

Las células T KIR+, al igual que las células NK, son capaces de producir IFN- $\gamma$  y con función citolítica inmediata. Mientras que en las NK, los KIR regulan la activación, la citotoxicidad y producción de citocinas, en células T presentan funciones divergentes. Los KIR inhibidores en T CD8+ regulan la función citotóxica y producción de IFN- $\gamma$  inducido por la activación; sin embargo, su función en células T CD4+ es desconocida, aunque se sugiere que su interacción inhibe la proliferación, pero no a las demás funciones efectoras. En cambio, los KIR activadores, en células T funcionan como receptores coestimuladores que promueven la activación de TCR. Consistente con esto, en clones  $CD4^+CD28^{null}KIR2DS2^+$  coestimulan señales de proliferación, pero no señales de citotoxicidad (van Bergen and Koning 2010).

Es relevante destacar la implicación de citocinas, como IL-15 e IL-21, en la expresión de KIR en ambas poblaciones. IL-15 es una citocina que pertenece a la familia de IL-2, IL-6 y GM-

CSF, producida principalmente por la línea monocitos/macrófagos. Esta citocina tiene diversos efectos en diferentes poblaciones celulares: en células T promueve tanto su activación, como la proliferación de Th1 y Th17; en células NK, es esencial para la supervivencia, activación y actividad citotóxica; al mismo tiempo que se ha reportado que promueven la expresión de KIR en células NK CD56<sup>dim</sup> (de Rham, Ferrari-Lacraz et al. 2007, Yang, Xu et al. 2015).

La IL-21 producida por células T activadas (Th1 y Th17) y células NKT, es esencial para la diferenciación, expansión y supervivencia de T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Se ha reportado que IL-21 está involucrada en la funcionalidad y supervivencia de las células NK, mediante la producción de IFN- $\gamma$  y promueve su actividad citotóxica, mediante la sobreexpresión de CD16 (de Rham, Ferrari-Lacraz et al. 2007).

Previamente se ha descrito la relevancia de IL-15 e IL-21 en AR; en el caso de IL-15, se han encontrado niveles séricos más altos en pacientes con AR en fase temprana comparados con individuos sanos, así mismo, estas concentraciones de IL-15 se han correlacionado con la presencia de autoanticuerpos (FR y anti-CCP), lo que sugiere un papel importante en la patogénesis de esta enfermedad (Lamana, Ortiz et al. 2010, Yang, Xu et al. 2015). En AR, la IL-21 presenta un papel esencial en la supervivencia y diferenciación a Th de las células T autorreactivas, al mismo tiempo, se ha observado que altos niveles séricos de IL-21 aumentan la poblaciones de T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>KIR<sup>+</sup> en pacientes con AR y disminuye la expresión de KIR en células NK (de Rham, Ferrari-Lacraz et al. 2007).

### 4.3 Estudios acerca de KIR en AR y respuesta a tratamiento

Varios desórdenes autoinmunes han sido asociados con genes *KIR* específicos, donde los *KIR* activadores han sido asociados a la inmunopatología de AR (Williams, Bateman et al. 2005).

En población hindú, se relacionó *KIR3DS1* y *KIR2DS2* como factores de susceptibilidad, mientras genes como *KIR2DL2*, *KIR2DL3* y *KIR3DL1* se asociaron con protección en AR (Prakash, Alam et al. 2014); en población taiwanesa se asoció solamente al gen *KIR2DS4* como factor de riesgo (Yen, Lin et al. 2006). En poblaciones europeas se ha asociado a los genes KIR con la presencia de manifestaciones extraarticulares, como vasculitis (Majorczyk, Pawlik et al. 2007). Por otro lado, en estudios de asociación de *KIR* y respuesta al tratamiento,

se ha reportado la asociación de *KIR2DL2/2DS2* con la respuesta anti-TNF- $\alpha$  (McGeough, Berrar et al. 2012); también, en población irlandesa se asoció *KIR2DS4full* con la mala respuesta a MTX (Majorczyk, Pawlik et al. 2014).

En estudios previos de nuestro equipo de trabajo se encontró asociación de los genes *KIR2DL2/2DS2/2DL3* con AR y la respuesta a *DMARDs* en poblaciones del occidente de México:

- En primera instancia, se asociaron los genes *KIR2DL2/S2* como factor de susceptibilidad, y *KIR2DL3* como factor de protección con AR en México (Ramirez-De los Santos, Sanchez-Hernandez et al. 2012)
- En un posterior estudio, se relacionó el incremento de las poblaciones celulares T  $CD4^+CD28^{null}KIR^+$  y de niveles de IL-21 (Ramírez-de los Santos, 2014)
- En el caso de tratamiento, recientemente se encontró asociación de los genes *KIR2DL2/S2* y la respuesta a *DMARDs* (Velarde-de la Cruz, Sanchez-Hernandez et al. 2016)

## 5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune de etiología multifactorial que afecta a las articulaciones. La interacción entre factores genéticos y ambientales puede influir en su progresión y respuesta al tratamiento.

Dentro de la historia natural de la enfermedad, la AR se puede dividir en dos etapas: temprana y establecida. En ambas fases se ha observado la participación de las poblaciones celulares T y NK. La subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> se ha asociado con el daño articular; mientras las células NK presentan un doble papel: en la articulación como promotor del proceso autoinmune y en periferia como inmunoreguladores de la respuesta adaptativa. Cabe destacar que en AR ambas poblaciones se encuentran alteradas en sangre periférica.

Ambas poblaciones pueden expresar receptores KIR, los cuales regulan su activación y función. Citocinas como IL-15 e IL-21, pueden influir la expresión de estos receptores y así afectar la actividad de esta población celular.

Estudios previos de nuestro equipo de trabajo han reportado la asociación de los genes *KIR* con AR y respuesta a *DMARDs* en individuos del occidente de México, donde se ha observado: 1) la asociación de los genes *KIR2DL2/S2* como factores de susceptibilidad y *KIR2DL3* como factor de protección en AR, 2) el incremento de células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>KIR<sup>+</sup> asociado a IL-21 en individuos con AR y 3) la asociación de *KIR2DL2/2DS2* con la respuesta al tratamiento a *DMARDs*.

Sin embargo, se desconoce la expresión de los receptores CD158b (*KIR2DL2/S2/L3*) en células NK y T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en la severidad de la enfermedad y su asociación con la respuesta al tratamiento con *DMARDs*.

Por lo que nuestra pregunta de investigación es,

**¿Está asociada la expresión de CD158b (*KIR2DL2*, *KIR2DS2* y *KIR2DL3*) de las células NK y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> con la respuesta a *DMARDs* en pacientes con AR?**

## 6 HIPÓTESIS

La buena respuesta a tratamiento con DMARDs se asocia con el incremento de expresión de CD158b en células NK y su disminución en células T CD4+CD28<sup>null</sup> en pacientes con AR

## 7 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de CD158b en células NK y T CD4+CD28<sup>null</sup> de sangre periférica de pacientes con AR tratados con *DMARDs*

### 7.1 Objetivos particulares

1. Determinar los porcentajes de células NK y T CD4+CD28<sup>null</sup> y expresión de CD158b de sangre periférica de pacientes con AR al inicio, a los 3 meses de tratamiento y en grupo de referencia
2. Correlacionar los porcentajes de células NK y T CD4+CD28<sup>null</sup> en pacientes al inicio y a los 3 meses de tratamiento
3. Evaluar la asociación de los porcentajes de células NK CD158b<sup>+</sup> y T CD4+CD28<sup>null</sup>CD158b<sup>+</sup> de sangre periférica de pacientes con la respuesta a tratamiento
4. Determinar la asociación de los genotipos *KIR2DL2/S2/L3* con la expresión de CD158b de células NK y T CD4+CD28<sup>null</sup> en sangre periférica de pacientes con AR
5. Valorar los niveles séricos de FR, anti-CCP, IL-15 e IL-21 y su asociación con la expresión de CD158b en la respuesta a tratamiento
6. Evaluar la asociación de la expresión de CD158b en las células NK y T CD4+CD28<sup>null</sup> de sangre periférica con los datos clínicos de pacientes con AR y su respuesta a tratamiento



## 8 DISEÑO METODOLÓGICO

**Tipo de estudio:** observacional, descriptivo y longitudinal

**Variables dependientes:**

Respuesta a *DMARDs*, porcentaje de poblaciones celulares NK y T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>, expresión CD158b (IFM, intensidad de fluorescencia media), niveles séricos de IL-15, IL-21, anti-CCP y FR

**Variables independientes:**

AR, genes: *KIR2DL2*, *2DS2* y *2DL3*

**Universo de estudio:**

**Conformado por dos grupos:**

**1. Grupo de pacientes con AR:**

40 sujetos con diagnóstico de AR. Al momento de incluirlos en la investigación se clasificaron en dos grupos considerando si están bajo tratamiento o no:

- 🔊 20 sujetos con AR con tratamiento en curso
- 🔊 20 sujetos con AR vírgenes a tratamiento con MTX (inicio y 3 meses)

**2. Grupo de referencia:**

20 sujetos clínicamente sanos

**Criterios de selección:**

**Criterios de inclusión**

**- Pacientes con AR:**

- 🔊 Pacientes con diagnóstico de AR, de acuerdo a criterios EULAR/ACR, 2010
- 🔊 Sin enfermedad autoinmune traslapada
- 🔊 Edad de 18 a 65 años
- 🔊 Ambos genero
- 🔊 Originarios del occidente de México (Jalisco, Nayarit, Colima, Michoacán, Zacatecas, Aguascalientes y Guanajuato) por al menos tres generaciones
- 🔊 No consanguíneos
- 🔊 Consentimiento informado firmado

- **Grupo de pacientes vírgenes a tratamiento**

- Pacientes sin tratamiento previo con *DMARDs* y/o glucocorticoides (al menos 3 meses)
- Candidatos a monoterapia con MTX

- **Grupo de pacientes con tratamiento previo**

- Pacientes con 1 año o más asistiendo, de forma constante, al servicio de reumatología del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”.
- Pacientes con monoterapia o terapia combinada con dosis bajas de glucocorticoide (< 5 mg/día)

- **Grupo de referencia:**

- Edad de 18 a 65 años
- No consanguíneos
- Individuos pareados en edad y género con el grupo de referencia
- Originarios del occidente de México por al menos tres generaciones
- Sin antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes
- Consentimiento informado firmado

**Criterios de no inclusión para ambos grupos:**

- Inmunodeficiencias
- Cáncer
- Enfermedades infecciosas
- Mujeres en etapa de embarazo

**Criterios de exclusión para ambos grupos:**

- Muestra contaminada y/o insuficiente
- Mal apego al tratamiento
- Desistimiento de ser incluido

**Sedes del estudio:**

Laboratorio de Inmunología en colaboración con el Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas (IICB), ambos del Centro Universitario de Ciencias de la Salud (CUCS) de la Universidad de Guadalajara. División de Inmunología del Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) del Instituto Mexicano del Seguro Social y Servicio de Reumatología del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde”.

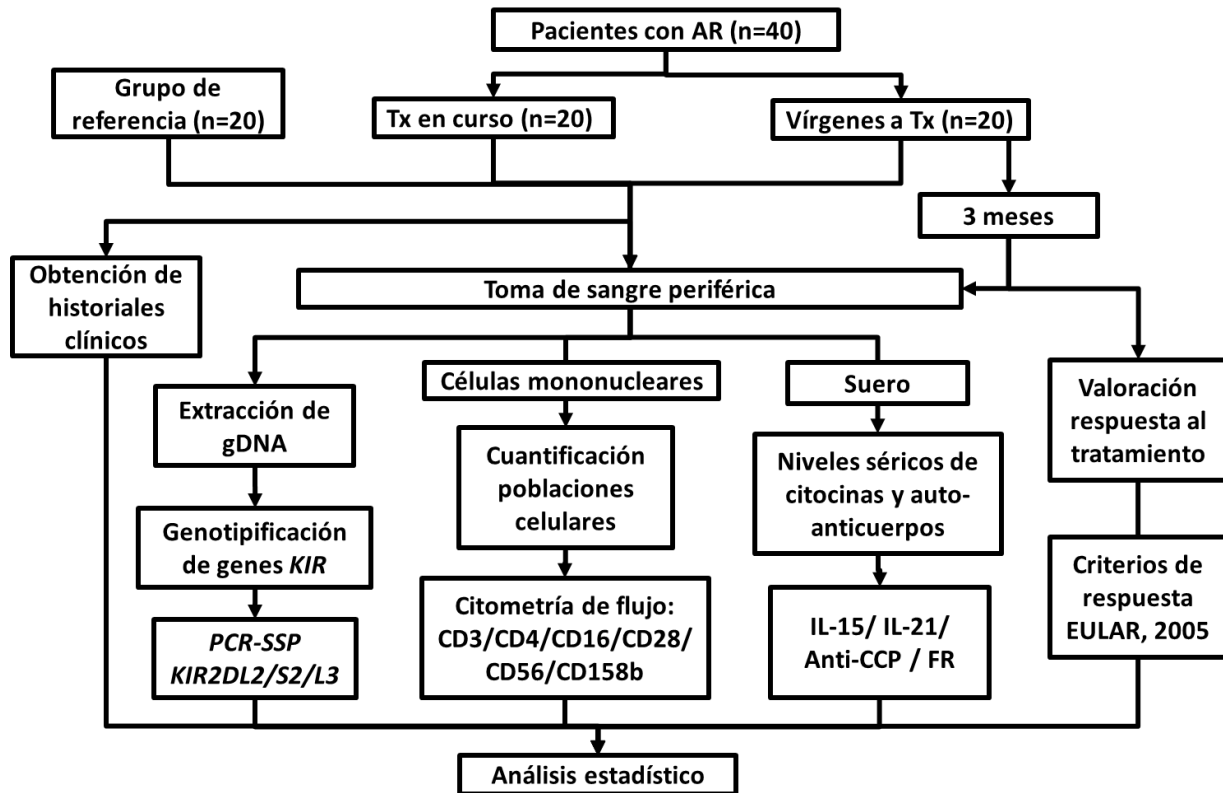
**Consideraciones éticas y legales:**

Para la inclusión de los sujetos de estudio se consideraron las normas y principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos, establecidos en la Declaración de Helsinki, revisada en la Asamblea General de la Asociación Médica Mundial (AMM), Fortaleza, Brasil, octubre 2013, el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y Comisión Interna de Investigación, Ética y de Bioseguridad del Centro Universitario de Ciencias de la Salud.

**Consideraciones de bioseguridad:**

Las muestras procesadas se manejaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo, así como el almacenamiento y destino final.

## 9 DIAGRAMA DE FLUJO



---

## 10 METODOLOGÍA

### 10.1 Captación de pacientes y grupo de referencia

Se incluyeron 20 individuos como grupo de referencia y 40 pacientes diagnosticados con AR. Los pacientes con AR se estratificaron en dos grupos: pacientes vírgenes a tratamiento (n=20) y con tratamiento en curso (n=20). Los pacientes vírgenes a tratamiento al inicio del estudio fueron tratados con MTX y se les dio seguimiento por 3 meses para la valoración de respuesta al tratamiento.

Un médico reumatólogo realizó la valoración clínica de los pacientes para el diagnóstico de AR. Los datos clínico-demográficos se obtuvieron a partir de los historiales clínicos: edad, género, tabaquismo, duración de la enfermedad y tratamientos previos al diagnóstico en la primera toma. Los datos clínicos como: dosis de *DMARDs*, grado de severidad de AR, análisis de laboratorio, hallazgos radiográficos, evaluación visual de dolor, índices de actividad de la enfermedad y la evaluación de respuesta terapéutica (DAS28, CDAI, ACR20/50/70) fueron registrados al inicio del estudio. En caso de los pacientes vírgenes a tratamiento, se registraron los datos tanto al inicio del estudio como a los 3 meses de tratamiento.

### 10.2 Tratamiento de los pacientes vírgenes a tratamiento

La elección y dosis de *DMARDs* utilizados, así como la respuesta al tratamiento de cada paciente fueron valoradas por un reumatólogo de la institución sede. La valoración de la respuesta al tratamiento fue realizada a los 3 meses y determinada de acuerdo del índice de actividad de la enfermedad, análisis de laboratorio y la evaluación visual de dolor.

La respuesta al tratamiento fue definida de acuerdo a los criterios dados por la *EULAR* del 2009 (Fransen and van Riel 2009). Los pacientes con una respuesta moderada o buena, como se explica en el Cuadro 10 fueron considerados como “respondedores”; así como pacientes con una mala respuesta fueron considerados como “no respondedores”.

**Cuadro 10. Criterios de respuesta EULAR de acuerdo al DAS 28**

Índice	Puntaje Actual	Diferencia de los puntajes	Respuesta
		$\leq 0.6$	Sin Respuesta
	$\leq 3.2$	$0.61 - 1.2$	Respuesta moderada
		$\geq 1.2$	Buena Respuesta
<b>DAS28</b>	3.21 – 5.1	$\leq 0.6$	Sin Respuesta
		$0.61 - 1.2$	Respuesta moderada
	$> 5.1$	$\geq 1.2$	Respuesta moderada
		$\leq 0.6$	Sin Respuesta
		$0.61 - 1.2$	Respuesta moderada
		$\geq 1.2$	Respuesta moderada

EULAR: del inglés, *European Union League Against Rheumatism*, DAS: del inglés: *Disease Activity Score* (Fransen and van Riel 2009)

### 10.3 Toma de sangre periférica

En ambos grupos (grupo de referencia y pacientes con AR), con previo consentimiento informado, se realizó una venopunción para la obtención de sangre periférica, en la fosa cubital del brazo, con previa asepsia local, utilizando como recolección el sistema *Vacutainer*. Al grupo de pacientes vírgenes a tratamiento se les realizaron dos tomas, una al inicio del estudio y otra a los 3 meses con el tratamiento.

De cada toma, se obtuvieron en total 3 tubos con volumen de 6 mL cada uno: 2 tubos con anticoagulante ( $K_2EDTA$  10.8 mg) y 1 tubo sin anticoagulante que previamente fueron rotulados con fecha, nombre del individuo y código de control.

### 10.4 Identificación de las poblaciones celulares NK y T $CD4^+CD28^{null}$ por citometría de flujo

#### 10.4.1 Aislamiento de células mononucleares

A partir de sangre periférica se separaron células mononucleares mediante un gradiente de densidad. Inicialmente se añadió 6 mL de la muestra sobre 4 mL de Lymphoprep (GIBCO *Laboratories*) y se centrifugó a 400 g durante 30 minutos. Se colectó el anillo de células mononucleares, se transfirió a un tubo cónico con 4 mL de PBS y se centrifugó a 400 g durante 8 minutos. Se decantó y se agregó 500  $\mu$ L de PBS. Se tomó 10  $\mu$ L de la muestra y se realizó el conteo celular con hematocitómetro. Una vez realizado el conteo, se colocó  $1 \times 10^6$  células en cada tubo y se realizó la tinción utilizando los anticuerpos de la tabla 11 para su posterior análisis por citometría de flujo.

### 10.4.2 Citometría de flujo

Para determinar las poblaciones T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>, NK y la expresión de CD158b en ambas poblaciones celulares se realizó citometría de flujo, mediante un multimarcaje, en el Cuadro 13 se describen los anticuerpos que se utilizaron.

**Cuadro 11. Titulación de anticuerpos**

Anticuerpos	Fluorocromos	Clona	Marca	Volumen (µL)
<b>CD3</b>	PE/Cy7	SK7	Biologend	1.25
<b>CD4</b>	Alexa Fluor 488	SK3	Biologend	1
<b>CD16</b>	APC/Fire 750	3G8	Biologend	1.25
<b>CD28</b>	APC	CD28.2	Biologend	1.25
<b>CD56</b>	PerCP/Cy5.5	5.1H11	Biologend	2.5
<b>CD158b*</b>	PE	DX27	Biologend	2.5

PE/Cy7: *Phycoerythrin/Cy7*; APC: *Allophycocyanin*; APC/Fire 750: *Allophycocyanin/Fire7*; PerCP/Cy5.5: *peridinin chlorophyll protein/Cy5.5*; PE: *Phycoerythrin*. \*: CD158b detecta indistintamente la expresión de los receptores KIR2DL2, KIR2DS2 y KIR2DL3.

Para cada muestra se emplearon 8 tubos: un control negativo (tubo 1), 6 controles *FMO* (del inglés, *Fluorescence Minus One*) (tubos 2-7) y el multimarcaje (tubo 8); el contenido y cantidad de cada tubo se describe en el Cuadro 11 y 12.

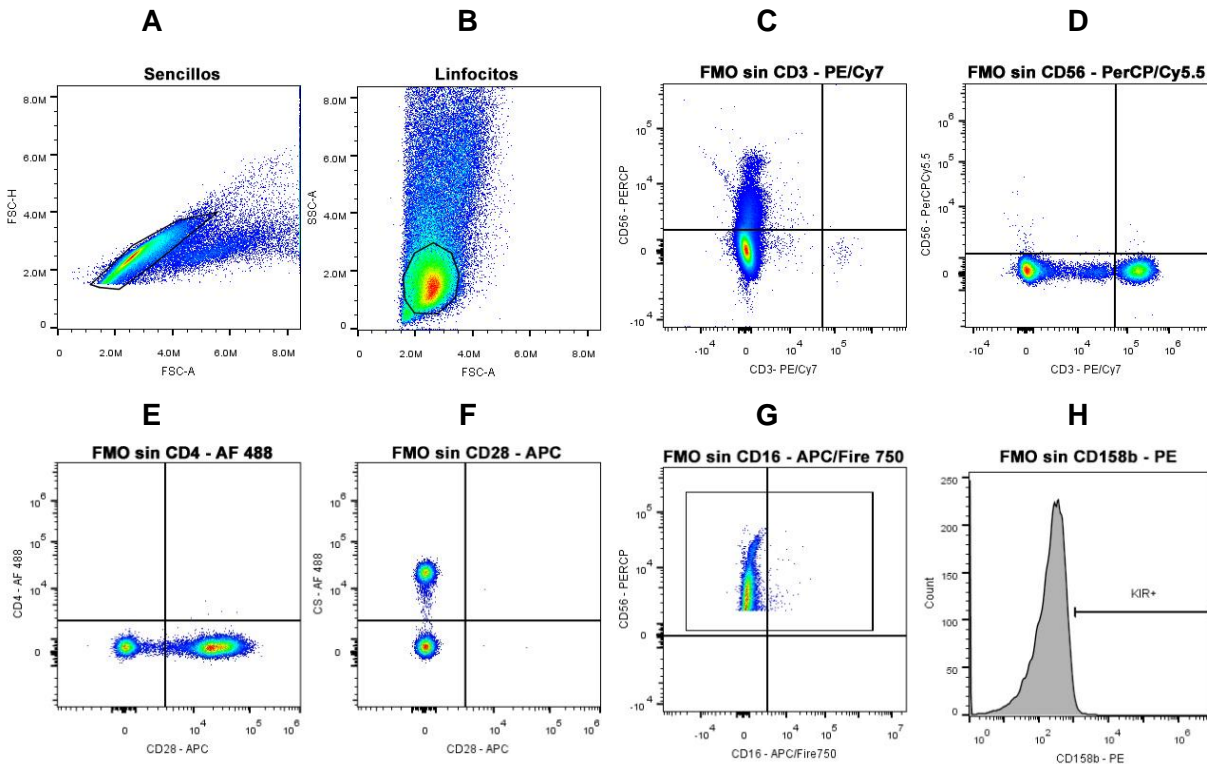
**Cuadro 12. Protocolo multiparamétrico**

Tubo	Contenido						Referencia
<b>1</b>	Células solas						<b>Blanco</b>
<b>2</b>	- - -	CD4	CD16	CD28	CD56	CD158b	<b>FMO control</b>
<b>3</b>	CD3	- - -	CD16	CD28	CD56	CD158b	
<b>4</b>	CD3	CD4	- - -	CD28	CD56	CD158b	
<b>5</b>	CD3	CD4	CD16	- - -	CD56	CD158b	
<b>6</b>	CD3	CD4	CD16	CD28	- - -	CD158b	
<b>7</b>	CD3	CD4	CD16	CD28	CD56	- - -	
<b>8</b>	CD3	CD4	CD16	CD28	CD56	CD158b	<b>Hexamarcaje</b>

*FMO*: del inglés, *Fluorescence minus one*

El procedimiento de marcaje consiste en la incubación de los tubos con los anticuerpos durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se añadió 2 mL de PBS y se centrifugó a 400 *g* durante 7 minutos. Se descarta el sobrenadante y se resuspende en 500 µL de PBS. Las muestras son almacenadas en oscuridad a 4°C. La adquisición de la muestra fue por el citómetro de flujo (Attune, *Applied Biosystem*®), y los datos obtenidos fueron analizadas mediante el software *FlowJo X 10.0.7r2*.

Se utilizó las lecturas de *FSC-A* y *FSC-H* (del inglés, *Forward Scatter*) para seleccionar los de *Singlets*, se realizó un *dotplot* con los ejes *FSC-A* y *SSC-A* (del inglés, *Side Scatter*) por medio del tamaño y complejidad, se eligió la población linfocitaria (Figura 6B). Los tubos dos al siete permiten descartar el ruido (fluorescencia inespecífica) que genera cada anticuerpo (Figura 6C-H).

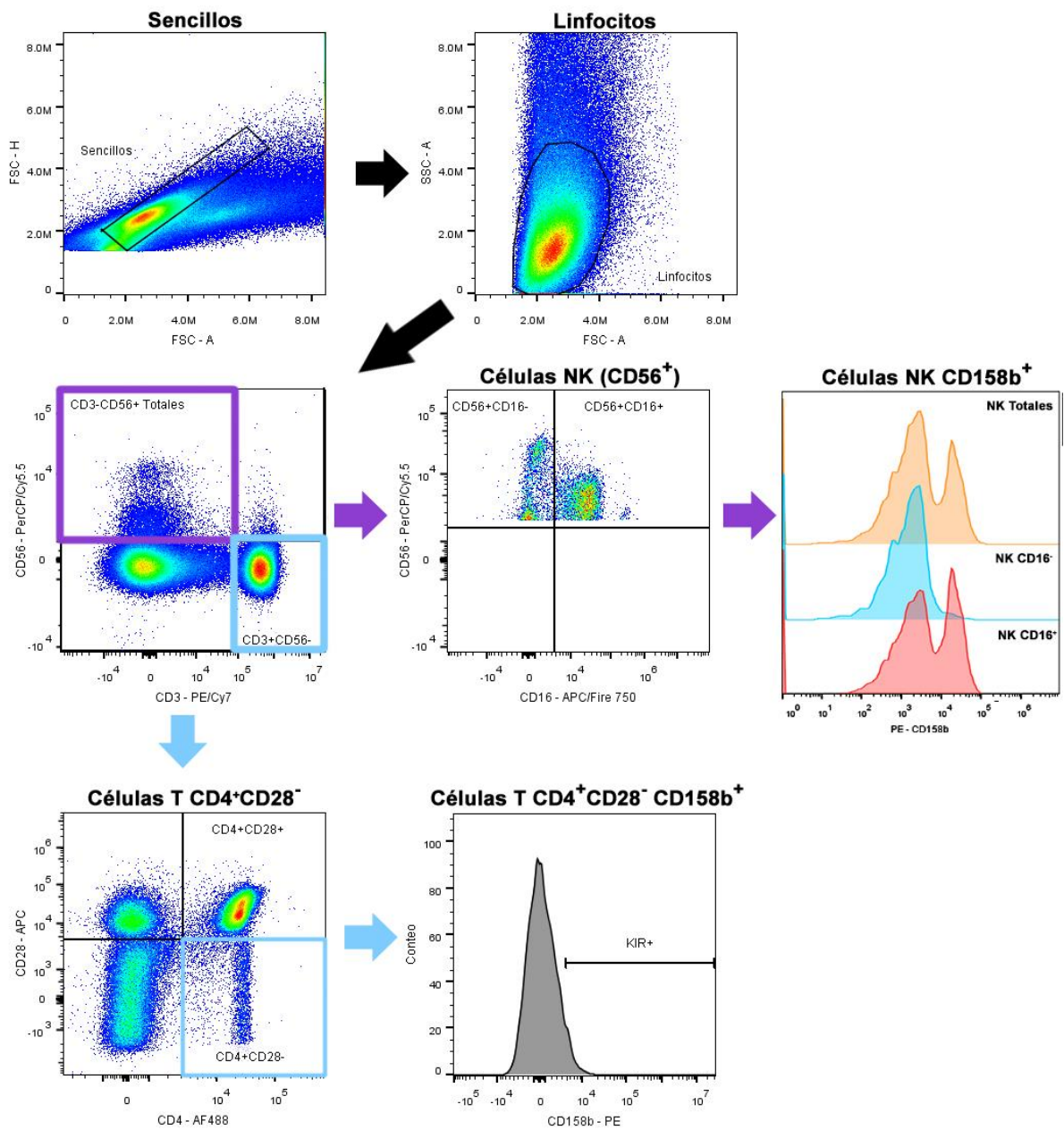


**Figura 6. Representación de la delimitación de poblaciones celulares**

**A:** Diferenciación de Sencillos, **B:** Selección de población linfocitaria. **C-H:** Controles *FMO* (*FMO*: del inglés, *Fluorescence minus one*)

Con base a las lecturas obtenidas del tubo con el multimarcaje (tubo 8), la elección de la población linfocitaria y la definición de los *gates* por los controles *FMO*, se realizaron *dotplots* con ejes correspondientes a diferentes combinaciones de anticuerpos. A partir de estas combinaciones se determinaron las poblaciones de interés: células NK ( $CD56^+CD16^+$ ) y células T  $CD4^+CD28^{null}$ , aquellas positivas a CD158b y la expresión de CD158b, mediante la intensidad de fluorescencia media (IFM). En la figura 7 se observa la representación de los *gates* para determinar las poblaciones de células T y NK y la expresión CD158b en dichas poblaciones.





**Figura 7. Determinación de poblaciones celulares NK y T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> CD158b<sup>+</sup>**

Definición de las poblaciones celulares NK y subpoblaciones de T, mediante la definición de *gates* por los controles *FMO* con ejes correspondientes a diferentes combinaciones de anticuerpos.

---

## 10.5 Cuantificación de niveles séricos de citocinas IL-15, IL-21 y autoanticuerpos

Para la determinación de niveles séricos de IL-15, IL-21 y autoanticuerpos (anti-CCP y FR) se separó el suero de la sangre periférica. La cuantificación de IL-15, IL-21 y anti-CCP se realizó mediante ELISA (Siglas en inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*); mientras que la determinación de FR fue mediante aglutinación de partículas de látex. Ambas metodologías se describen a continuación.

### 10.5.1 Cuantificación de niveles séricos de IL-15 e IL-21

Para cuantificar IL-15 e IL-21 se utilizó el kit *ELISA MAX<sup>TM</sup> Deluxe Sets* de *BioLegend<sup>TM</sup>*. Los reactivos y materiales se prepararon previamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se añadió 100 µL de anticuerpo de captura en todos los pozos de la placa y se incubó durante 14 – 16 horas a 4°C. Posteriormente a la incubación, se lavó la placa con 300 µL por pozo con buffer de lavado (PBS + 0.05% de tween-20). Se bloqueó sitios no específicos incubando durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente con 200 µL de solución diluyente. Después de la incubación, se realizaron 4 lavados.

Durante el periodo de incubación anterior, se prepararon los estándares de cada citocina, para IL-15: 500, 250, 125, 62.5, 31.3 15.6, 7.8 pg/mL; para IL-21: 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5 31.3 pg/mL. Al finalizar la incubación y lavado de la placa, se añadió 100 µL de los estándares y de las muestras. Se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación constante. Posteriormente, se lavó la placa y se añadió 100 µL de anticuerpo de detección y se incubó por 1 hora en agitación.

Después de 4 lavados, se adicionó 100 µL de avidina-HRP a cada pozo, se incubó por de 30 minutos y se realizó el ultimo lavado. Se añadió 100 µL de una solución sustrato se incubó durante 15 minutos en oscuridad. Finalmente se añadió 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2N como solución de paro. Se realizó la lectura de absorbancia a 450 y 570 nm (lector de microplacas ELISA RT2100C).

---

### 10.5.2 Cuantificación de niveles séricos de autoanticuerpos

Para cuantificar los niveles de anti-CCP se utilizó el Kit de ELISA de EUROIMMUN®. Las muestras se preparan previamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se transfirieron 100 µL de los calibradores (1, 5, 20, 100, y 200 RU/mL; RU: del inglés, *relative units*), controles (positivos y negativos) y muestras de pacientes a la placa y se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 300 µL de buffer de lavado (PBS + 0.05% de tween-20), se añadió 100 µL de enzima conjugada en cada pozo y incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionaron 100 µL de solución sustrato y se incubó durante 30 minutos protegido de la luz. Finalmente se añadió 100 µL de solución de paro a cada pozo y se realizó la lectura a 450 y 630 nm dentro de los siguientes 30 minutos (lector de microplacas ELISA RT2100C)..

Para determinar el factor reumatoide se utilizó el Kit de factor reumatoide de *BioSystems*®. El instrumento y reactivos se prepararon de acuerdo al inserto del *kit*. Se añadió 500 µL de suero, 0.8 mL del reactivo A (solución buffer) y 0.2 mL del reactivo B (Suspensión de partículas de látex sensibilizadas con gamma-globulina humana). La lectura de la absorbancia fue realizada a 650 nm a los 2 minutos de efectuar la mezcla (Analizador de química clínica y turbidimetría BA400, *Biosystems*).

### 10.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron por: estadística descriptiva (medidas de tendencia central y de dispersión), análisis de comparación simple para variables cuantitativas (prueba t de *Student*, U de *Mann Whitney*) y cualitativas (prueba exacta de Fisher,  $X^2$ ); comparaciones múltiples (*Kruskall Wallis* / Prueba de *Friedman* con corrección de *p* con *Dunn* y correlación simple (correlación *Spearman*). Se consideró una diferencia significativa de  $p < 0.05$ . El análisis estadístico se realizó mediante el programa *GraphPad Prism V. 6.01*.

---

## 11 RESULTADOS

Nuestro universo de estudio estuvo conformado por 3 grupos: un grupo de referencia (n = 20), pacientes vírgenes a Tx (n = 20) y pacientes con tratamiento en curso (n = 20). Los pacientes vírgenes a Tx, se les dio monoterapia con MTX y se les evaluó su respuesta a tratamiento a los 3 meses. La respuesta al tratamiento fue definida de acuerdo a los criterios dados por la *EULAR* del 2009 (Fransen and van Riel 2009) por un médico reumatólogo y fueron clasificados en respondedores (n = 10) y no respondedores (n = 10).

### 11.1 Características clínico-demográficas de pacientes con AR y grupo de referencia

Se obtuvieron los datos clínicos y demográficos de los grupos de estudio, los cuales se presentan en el Cuadro 13. En el caso de los grupos de pacientes respondedores y no respondedores se obtuvieron los datos clínicos al inicio y a los 3 meses de tratamiento.

En el grupo de referencia se incluyeron 17 mujeres y 3 hombres con una edad promedio de  $44.6 \pm 9.78$  años. El grupo de pacientes respondedores, está conformado por 8 mujeres y 2 hombres, con una edad promedio de  $45.8 \pm 9.6$  años. El grupo de no respondedores estuvo compuesto por 9 mujeres y 1 hombre, con una edad promedio de  $44.7 \pm 10.5$  años. El grupo de pacientes con Tx en curso estuvo constituido de 19 mujeres y 1 hombre, con una edad promedio de  $56.68 \pm 11.47$  años (Cuadro 13).

**Cuadro 13. Características clínicas de los pacientes con AR**

	Grupo de referencia n = 20	Respondedores n = 10		No respondedores n = 10		Tx en curso n = 20
<b>Edad</b>	44.6 ± 9.8	45.8 ± 9.6		44.7 ± 10.5		56.7 ± 11.5
<b>Género (n)</b>						
Femenino	17	8		9		19
Masculino	3	2		1		1
<b>Duración de la enfermedad (años)</b>						
Temprana (< 1 año)	na	0.91 ± 0.6		1.93 ± 1.7		9.33 ± 8.5
Establecida (> 1 año)	na	2		5		18
<b>Indicadores de inflamación</b>						
Proteína C reactiva (mg/dL)	nd	16.4 ± 15.5		32.6 ± 32.6		33.4 ± 15
VSG (mm/hr)	18.1 ± 4.6	35.7 ± 13.0		40.7 ± 10.8		16.3 ± 20
<b>Autoanticuerpos</b>						
<b>FR (U/mL)</b>						
	12 ± 2.2	Inicio	3 meses	Inicio	3 meses	
Negativo (n)	20	58.2 ± 39	55.6 ± 37	85.5 ± 13	82.5 ± 22	63.5 ± 37
Positivo (n)	0	4	6	0	10	5
<b>Anti-CCP (RU/mL)</b>	1.1 ± 0.8	65.8 ± 49	69.5 ± 80	75.5 ± 70	79.6 ± 66	89.8 ± 87
Negativo (n)	20	4	5	0	5	5
Bajos positivos (n)	0	0	0	2	3	3
Altos positivos(n)	0	6	6	8	12	12
<b>Actividad de la enfermedad</b>						
SDAI	na	28.1 ± 13	10.5 ± 7	22.5 ± 14	19.9 ± 13	19.7 ± 15
DAS28-VSG	na	5.2 ± 1	3.7 ± 1	4.5 ± 1	4.7 ± 1	4.2 ± 1
DAS28-pCr	na	5 ± 1	3.1 ± 1	4.2 ± 2	4.4 ± 2	3.7 ± 1
CDAI	na	24 ± 12	9.5 ± 5	19.7 ± 12	17 ± 11	15.6 ± 12
<b>Tratamiento (n)</b>						
<b>DMARDs</b>						
<b>MTX</b>						
Dosis terapéutica óptima	na	0	10	0	10	0
Dosis subóptima	na	0	0	0	0	4
LEF (100 mg/sem)	na	0	0	0	0	1
MTX+SSZ (12-20mg+500mg-2gr)	na	0	0	0	0	8
MTX+LEF (20 mg + 150mg)	na	0	0	0	0	1
MTX+SSZ+CQ (15mg+1gr+300mg)	na	0	0	0	0	3
Biológico	na	0	0	0	0	3
<b>Glucocorticoides (5 mg)</b>						
<b>AINES</b>	na	0	4	0	4	6
	na	0	10	0	10	10

SDAI: del inglés, Simple Disease Activity Index; DAS28: del inglés, Disease Activity Score- 28 joints; CDAI: Clinical Disease Activity Index. MTX: metotrexate; LEF: leflunomida; SSZ: sulfasalazina; CQ: cloroquina. Valores normales anti-CCP: <5 RU/mL. RU: del inglés, relative units. Dosis terapéutica óptima de MTX (>15mg/sem); Dosis subóptima: <15mg/sem. Altos positivos se consideran títulos 3 veces mayores al valor normal. Valores normales de FR <30 U/mL. na: no aplica

## 11.2 Poblaciones celulares NK y T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en la respuesta a tratamiento.

Se determinó y comparó los porcentajes de las poblaciones celulares NK y T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> entre los grupos de estudio (Figura 8) (Cuadro 18, Anexo III).

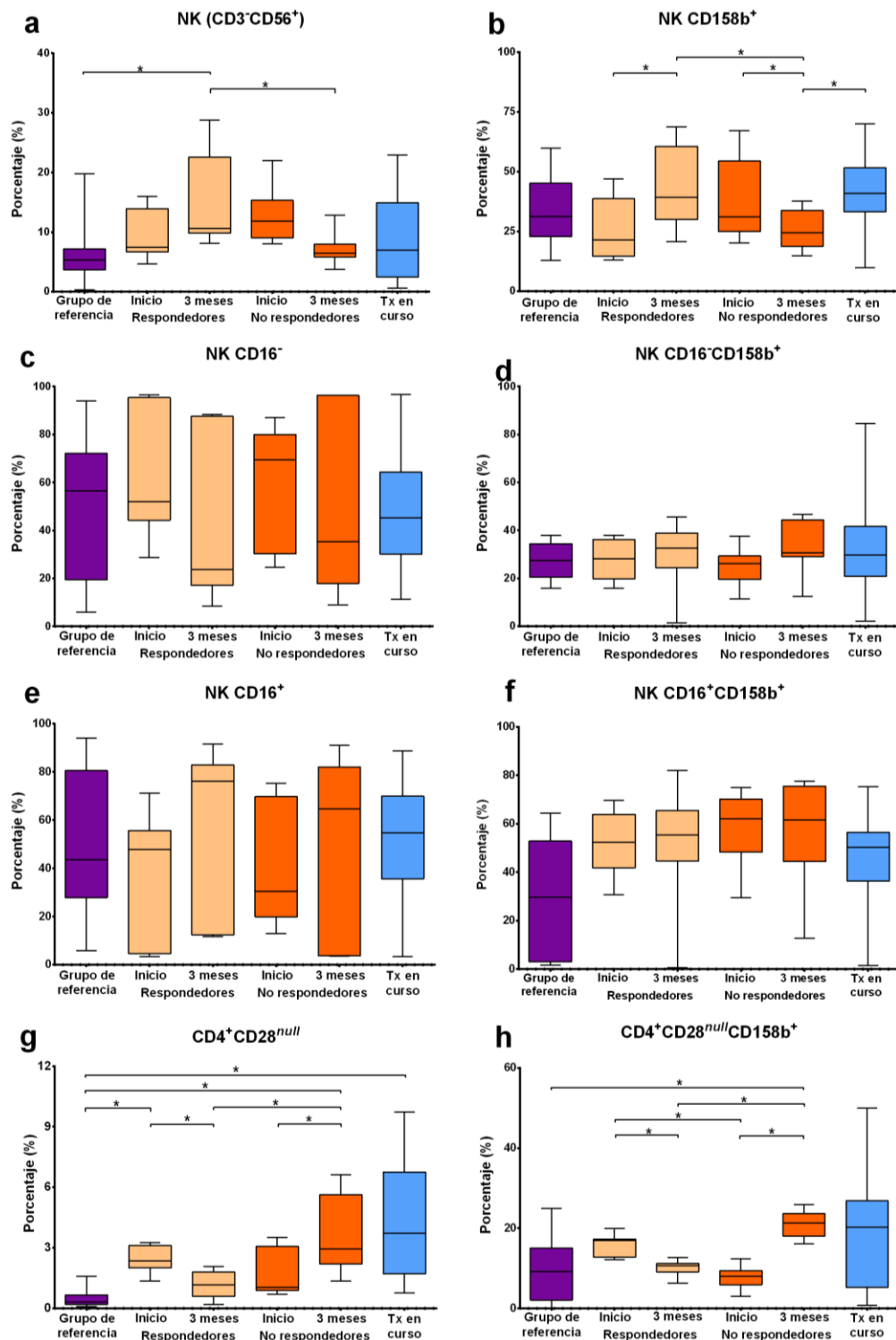
El porcentaje de células NK al inicio del Tx de respondedores y no respondedores no mostró diferencia significativa con respecto a los otros grupos de estudio. Sin embargo, en el grupo de respondedores a los 3 meses de Tx, se observó un mayor porcentaje de esta población

celular comparado con el grupo de no respondedores y el grupo de referencia (15.17% vs 7.05%,  $p = 0.033$  y 15.17% vs 5.55%,  $p = 0.033$ , respectivamente) (Figura 8a).

El porcentaje de células NK CD158b+ al inicio del Tx, tanto en respondedores como en no respondedores, no presentaron diferencia significativa con respecto a los otros grupos de estudio. Sin embargo, a los 3 meses de Tx, esta población celular aumentó significativamente en el grupo de respondedores (26.33% vs 42.31%  $p = 0.031$ ) y disminuyó en el grupo de no respondedores (39.07% vs 26.30%,  $p = 0.041$ ). Al mismo tiempo, el grupo respondedores a los 3 meses de Tx y pacientes en curso de Tx presentaron porcentajes más altos de NK CD158b+ que el grupo de no respondedores a 3 meses de Tx (41.67% vs 26.30%,  $p = 0.031$  y 42.31% vs 26.30%,  $p = 0.042$ , respectivamente) (Figura 8b).

El porcentaje de células T CD4+CD28<sup>null</sup> al inicio del Tx, fue mayor en el grupo de respondedores que en el grupo de referencia (2.41% vs 0.47%,  $p = 0.01$ ). A los 3 meses de Tx, esta población celular disminuyó en el grupo de respondedores, a diferencia de los no respondedores donde se observó un incremento (2.41% vs 1.18%,  $p = 0.031$  y 1.79% vs 3.69%,  $p = 0.002$ ; respectivamente). El porcentaje de células T CD4+CD28<sup>null</sup> en no respondedores a 3 meses de Tx, fue mayor con respecto al grupo de respondedores y el grupo de referencia (3.69% vs 1.18%,  $p = 0.002$  y 3.69% vs 0.47%,  $p = 0.001$ ; respectivamente). Al mismo tiempo, los pacientes con Tx en curso presentaron un mayor porcentaje de T CD4+CD28<sup>null</sup> comparado con el grupo de referencia (4.22 vs 0.47%,  $p = 0.001$ ) (Figura 8g).

El porcentaje de células T CD4+CD28<sup>null</sup>CD158+ al inicio del Tx del grupo de respondedores fue mayor comparado con el grupo de no respondedores (15.67% vs 7.84%,  $p = 0.045$ ). A los 3 meses de Tx, esta población celular disminuyó en el grupo de respondedores (15.67% vs 10.10%,  $p = 0.016$ ); mientras que, en los no respondedores, se observó un incremento (7.84% vs 21.02%,  $p = 0.0002$ ). Al mismo tiempo, el grupo de no respondedores a 3 meses de Tx presentó un mayor porcentaje de T CD4+CD28<sup>null</sup>CD158+ comparado con el grupo de respondedores de 3 meses de Tx y el grupo de referencia (21.02% vs 10.10%,  $p = 0.0002$  y 21.02% vs 9.57%,  $p = 0.001$ ; respectivamente) (Figura 8h).



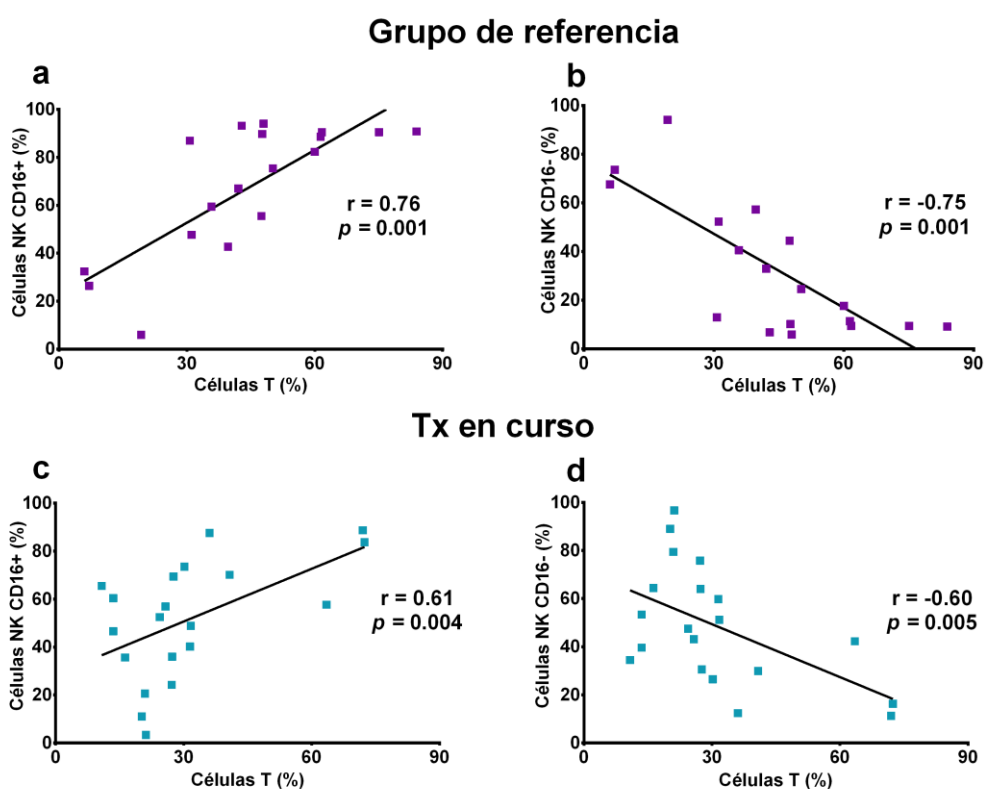
**Figura 8. Poblaciones celulares en células NK y T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en pacientes con AR y grupo de referencia**

Grupo de referencia (n = 20), respondedores (n = 10), no respondedores (n = 10) y pacientes con Tx en curso (n = 20). Se muestran los porcentajes de (a) células NK, (b) células NK CD158b<sup>+</sup>, (c) células NK CD16<sup>+</sup>, (d) células NK CD16<sup>+</sup>CD158b<sup>+</sup>, (e) células NK CD16<sup>+</sup>, (f) células NK CD16<sup>+</sup>CD158b<sup>+</sup>, (g) células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> y (h) células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>CD158b<sup>+</sup>. Prueba realizada: prueba de Friedman y prueba de Kruskal-Wallis, ambas con corrección de Dunn. \*p < 0.05.



Considerando las interacciones reportadas entre células NK y T en AR por Shi, *et al.*, 2011; se determinó la relación entre las poblaciones celulares NK y T en pacientes con AR; para ello, se correlacionó el porcentaje de las poblaciones celulares en cada uno de los grupos de estudio (Figura 9 y 10).

En el grupo de referencia y pacientes con Tx en curso, se encontró una correlación positiva entre células T con la población NK CD16<sup>+</sup> ( $r = 0.76$ ,  $p = 0.001$  y  $r = 0.61$ ,  $p = 0.004$ ; respectivamente) y una correlación negativa entre células T con NK CD16<sup>-</sup> ( $r = -0.75$ ,  $p = 0.001$  y  $r = -0.60$ ,  $p = 0.005$ ; respectivamente) (Figura 9).

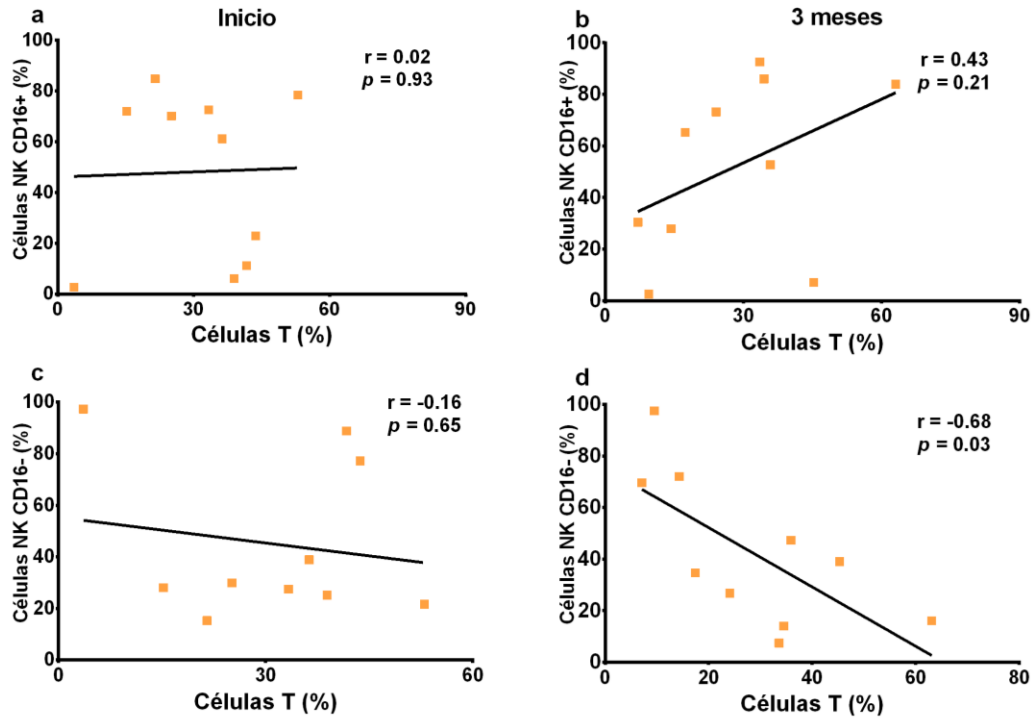


**Figura 9. Células T totales y subpoblaciones de células NK en grupo de referencia y pacientes AR con Tx en curso.** Grupo de referencia  $n = 20$ , pacientes con Tx en curso  $n = 20$ . Se muestran las correlaciones de células T totales con: (a) NK CD16<sup>+</sup> del grupo de referencia, (b) NK CD16<sup>-</sup> del grupo de referencia, (c) NK CD16<sup>+</sup> de pacientes con Tx en curso y (d) NK CD16<sup>-</sup> de pacientes con Tx en curso. Tx: tratamiento. Prueba de Spearman

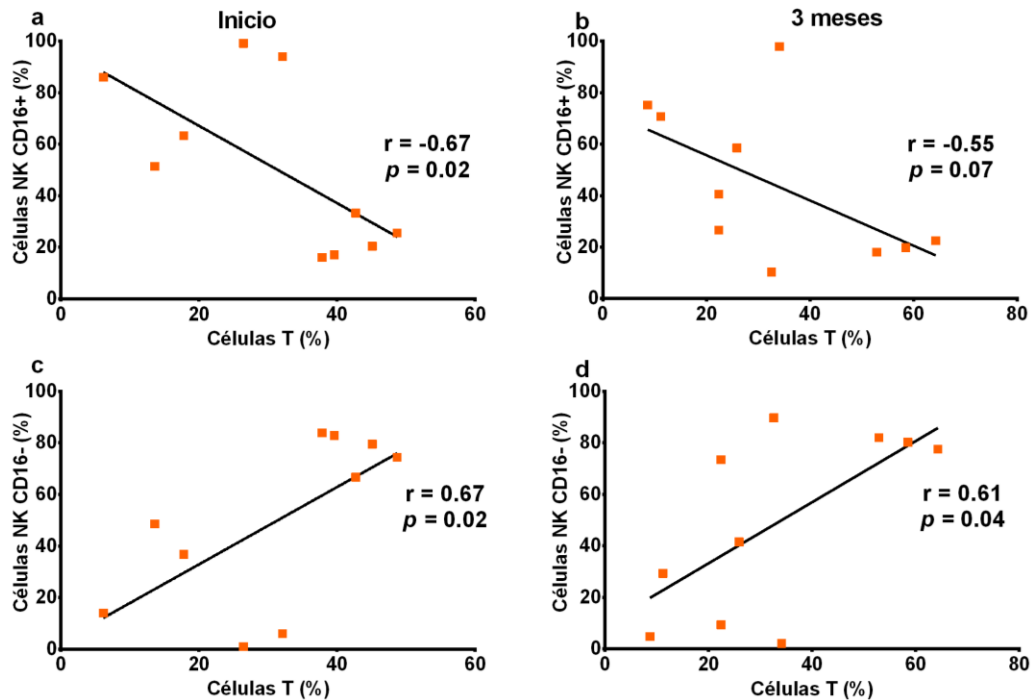
En contraste, en pacientes respondedores a Tx no se encontró correlación entre células T y células NK CD16<sup>-</sup> ( $r = -0.68$ ,  $p = 0.03$ ) (Figura 10d). En no respondedores, se observó una correlación negativa entre células T y células NK CD16<sup>+</sup> al inicio del estudio ( $r = -0.67$ ,  $p = 0.02$ ); además de una correlación positiva entre células T con la población NK CD16<sup>-</sup> ( $r = 0.67$ ,  $p = 0.02$  y  $r = 0.61$ ,  $p = 0.04$ ; respectivamente) (Figura 10).



### Respondedores



### No respondedores



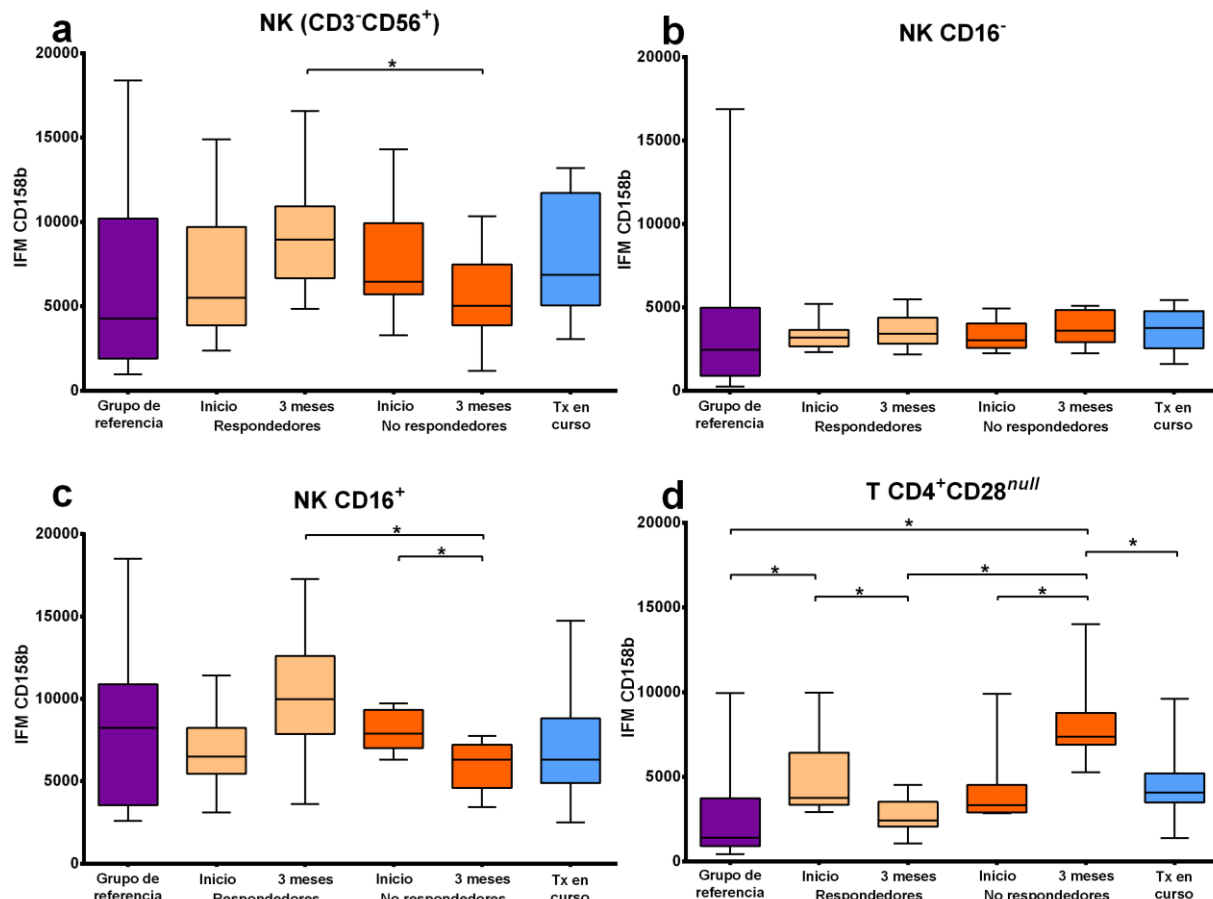
**Figura 10. Células T totales y subpoblaciones de células NK en respondedores y no respondedores**  
 Pacientes respondedores  $n = 10$  y pacientes no respondedores  $n = 10$ . Se muestran las correlaciones de células T totales con: (a) NK CD16+ al inicio del Tx, (b) NK CD16+ a los 3 meses de Tx, (c) NK CD16- al inicio de Tx y (d) NK CD16- a los 3 meses de Tx. Tx: tratamiento. Prueba realizada: Prueba de Spearman

### 11.3 Expresión de CD158b en la respuesta a tratamiento.

Se evaluó la expresión de CD158b (IFM) en las poblaciones NK y T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> de los grupos de estudio (Figura 11) (Cuadro 19, Anexo III).

La expresión de CD158b en células NK y NK CD16<sup>+</sup> al inicio del Tx, de respondedores y no respondedores no presentaron diferencia significativa comparada a los otros grupos de estudio. Sin embargo, a los 3 meses de Tx se observó un decremento de expresión en las células NK CD16<sup>+</sup> del grupo de no respondedores (8066 ± 1158 vs 6000 ± 1503;  $p = 0.003$ ) (Figura 11c). La expresión de CD158b en células NK y NK CD16<sup>+</sup> del grupo de no respondedores a 3 meses de Tx fue menor comparado con el grupo de respondedores a 3 meses de Tx (5624 ± 2730 vs 9324 ± 3495;  $p = 0.04$  y 6000 ± 1503 vs 10063 ± 3671;  $p = 0.01$ ; respectivamente) (Figura 11a y c).

La expresión de CD158b en células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> al inicio del Tx en el grupo de respondedores fue mayor que en el grupo de referencia (1719 ± 1322 vs 4951 ± 2247,  $p = 0.006$ ). A los 3 meses de Tx, se observó una disminución de expresión en el grupo de respondedores (4951 ± 2247 vs 2652 ± 1047;  $p = 0.002$ ), mientras que en no respondedores la expresión de CD158b aumentó (4263 ± 2251 vs 7986 ± 2496;  $p = 0.001$ ). La expresión de CD158b en no respondedores fue mayor comparado con respondedores a 3 meses de Tx, pacientes con Tx en curso y grupo de referencia (7986 ± 2496 vs 2652 ± 1047,  $p = 0.001$ , 7986 ± 2496 vs 4933 ± 2614,  $p = 0.01$  y 7986 ± 2496 vs 1719 ± 1322,  $p = 0.002$ ; respectivamente) (Figura 11d).



**Figura 11. Expresión de CD158b en células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> y células NK en pacientes con AR y grupo de referencia**  
 Grupo de referencia (n = 20), respondedores (n = 10), no respondedores (n = 10) y pacientes con Tx en curso (n = 20). Se muestra la expresión de CD158b (a) en células NK, (b) células NK CD16<sup>-</sup>, (c) células NK CD16<sup>+</sup> y (d) células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>. Prueba realizada: prueba de Friedman con corrección de Dunn (datos pareados) y prueba de Kruskal-Wallis con corrección de Dunn (datos no pareados). \*p < 0.05.

### 11.3.1 Genotipos *KIR2DL2/2DS2/2DL3* y expresión de CD158b en respuesta a tratamiento

Debido a que el anticuerpo anti-CD158b utilizado en citometría detecta *KIR2DL2*, *2DS2* y *2DL3* indistintamente, se realizó la genotipificación para inferir que receptores son los que podríamos estar detectando en cada individuo.

Para determinar la presencia/ausencia de los 3 genes *KIR* se realizó *PCR-SSP* (del inglés, *Polymerase Chain Reaction - Specific Sequence Primers*) basada en metodología establecida por Vilches, 2007 (Anexo II) (Vilches, Castano et al. 2007)

En primera instancia se determinaron las frecuencias génicas de *KIR2DL2*, *KIR2DS2* y *KIR2DL3*; y de los genotipos *KIR2DL2/S2/L3* del grupo de referencia y pacientes vírgenes a Tx. En donde no se encontró diferencia significativa (Cuadro 14).

**Cuadro 14. Genes *KIR* en pacientes con AR y grupo de referencia**

	Grupo de referencia %	Pacientes AR %
<b>Genes <i>KIR</i></b>		
<i>KIR2DL2</i>	70	83
<i>KIR2DS2</i>	65	53
<i>KIR2DL3</i>	100	100
<b>Genotipos <i>KIR2DL2/S2/L3</i></b>		
+ / + / +	65	53
+ / - / +	5	30
- / + / +	0	0
- / - / +	30	17

Grupo de referencia n = 20; Pacientes con AR n = 40. Prueba realizada: Prueba exacta de Fisher

Considerando estos datos se determinaron las frecuencias génicas de *KIR2DL2*, *KIR2DS2* y *KIR2DL3* de respondedores, no respondedores y grupo de Tx en curso; al comparar las frecuencias, no se encontró diferencia significativa. Al mismo tiempo se determinaron los genotipos *KIR2DL2/S2/L3*, donde se encontraron 3 genotipos: *KIR2DL2+/S2+/L3+*, *KIR2DL2+/S2-/L3+* y *KIR2DL2-/S2-/L3+*. Al determinar las frecuencias de los genotipos no se encontró diferencia significativa. (Cuadro 15).

**Cuadro 15. Genes *KIR* en respondedores, no respondedores y grupo de referencia**

	Grupo de referencia %	Respondedores %	No respondedores %	Tx en curso %
<b>Genes <i>KIR</i></b>				
<i>KIR2DL2</i>	70	70	100	80
<i>KIR2DS2</i>	65	60	40	55
<i>KIR2DL3</i>	100	100	100	100
<b>Genotipos <i>KIR2DL2/S2/L3</i></b>				
+ / + / +	65	60	40	55
+ / - / +	5	10	60	25
- / + / +	0	0	0	0
- / - / +	30	30	0	20

Grupo de referencia n=20; respondedores n=10; no respondedores n=10; Tx en curso n=20.

Considerando los genotipos *KIR2DL2/2DS2/2DL3* en los grupos de estudio, se evaluó si había diferencia de expresión de CD158b. Para ello los grupos de estudio se clasificaron de acuerdo a los genotipos *KIR2DL2/2DS2/2DL3* y se comparó la expresión de CD158b (IFM) en las poblaciones celulares NK y células T ( $CD4^+CD28^{null}$ ), pero no se encontró diferencia significativa entre los genotipos (Figura 12).

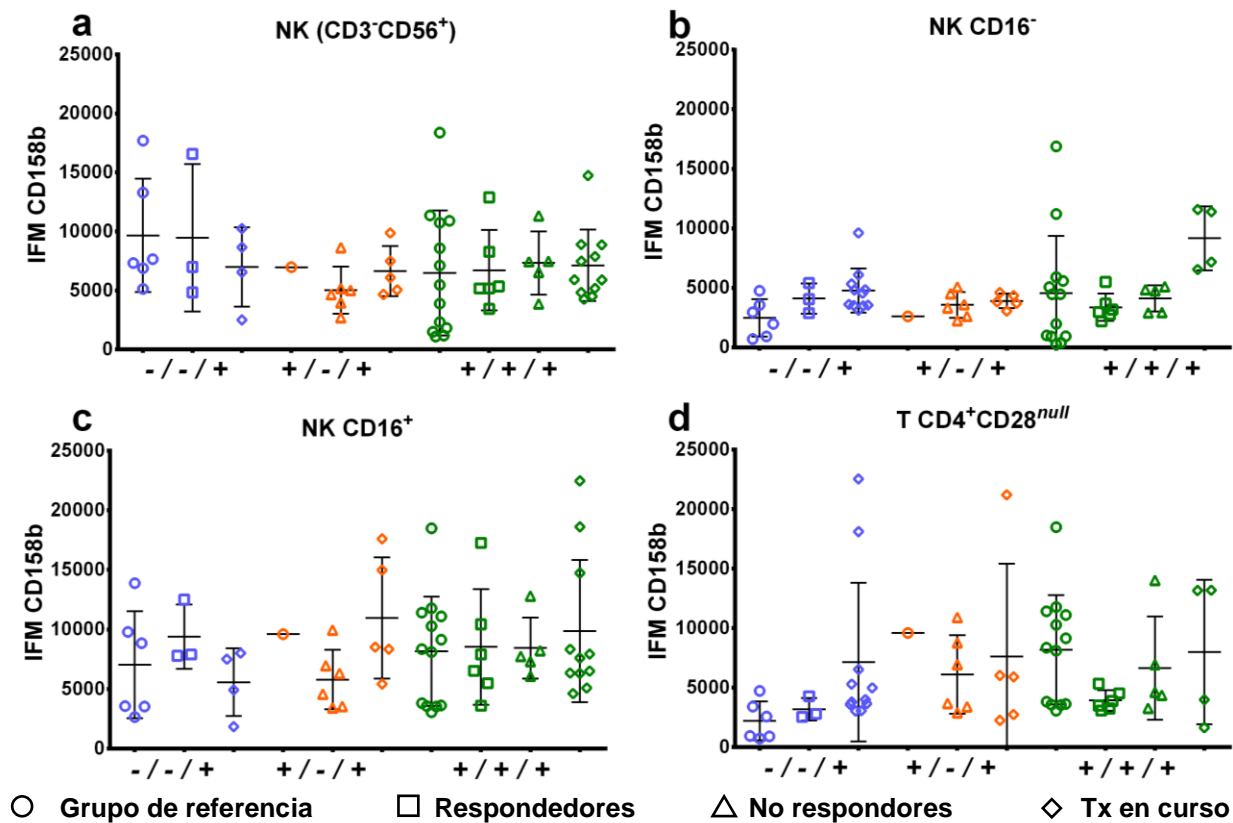
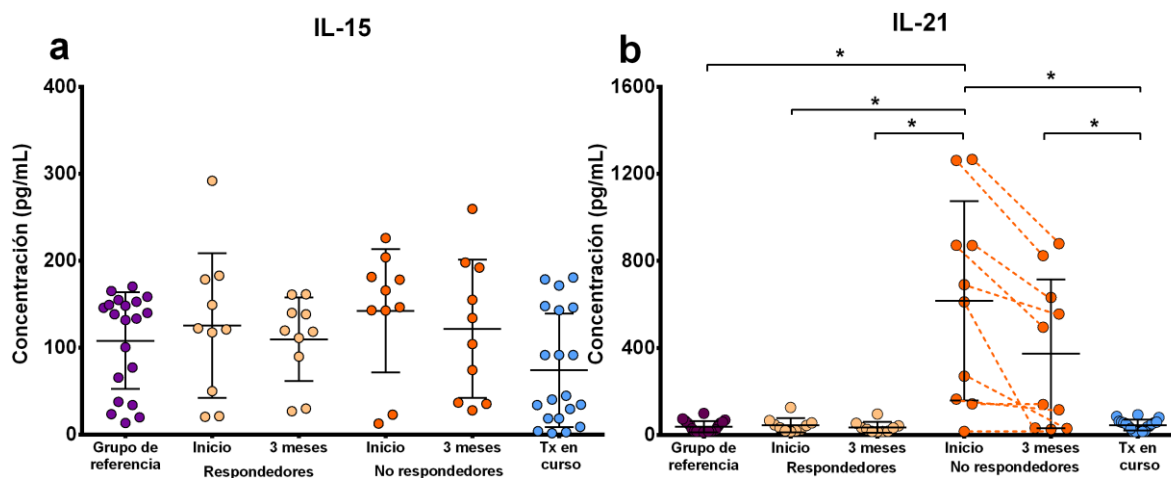


Figura 12. Expresión de CD158b de acuerdo al genotipo *KIR2DL2/2DS2/2DL3* de pacientes con AR y grupo de referencia. Grupo de referencia n = 20; respondedores n = 10; no respondedores n = 10; pacientes con Tx en curso n = 20. Se muestra la expresión de CD158b en (a) células NK, (b) células NK CD16<sup>-</sup>, (c) células NK CD16<sup>+</sup> y (d) células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>. d: Expresión de CD158b en células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>. Prueba realizada: Prueba de Friedman con prueba de Dunn. IFM: intensidad de fluorescencia media. \*p < 0.05.

### 11.4 Niveles de IL-15 e IL-21 en respuesta al tratamiento

En estudios previos realizados por De Rham, *et al.* y Ramírez de los Santos, *et al.*, se ha observado la influencia de IL-15 e IL-21 en las poblaciones celulares NK y T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>, por lo tanto, se cuantificaron y compararon los niveles séricos de estas citocinas en los grupos de estudio (Figura 13) (Cuadro 20, Anexo III).

Se compararon los niveles de IL-15 entre los grupos de estudio, sin encontrarse diferencia significativa (Figura 13a). Los valores séricos de IL-21, fueron más elevados al inicio del Tx en no respondedores ( $616.9 \pm 457.4$  pg/mL), comparados con los respondedores (inicio:  $45.22 \pm 33.17$  pg/mL,  $p = 0.001$  y 3 meses:  $35.08 \pm 24.90$  pg/mL,  $p = 0.001$ ) y el grupo de referencia ( $38 \pm 25.64$  pg/mL,  $p = 0.002$ ). Mientras a los 3 meses, los pacientes no respondedores de Tx presentaron niveles más altos de IL-21 que los pacientes con Tx en curso ( $41.60 \pm 73.1$  pg/mL vs  $45.10 \pm 24.82$  pg/mL,  $p = 0.035$ ); al comparar los valores con los no respondedores, no se encontró diferencia significativa (Figura 13b).



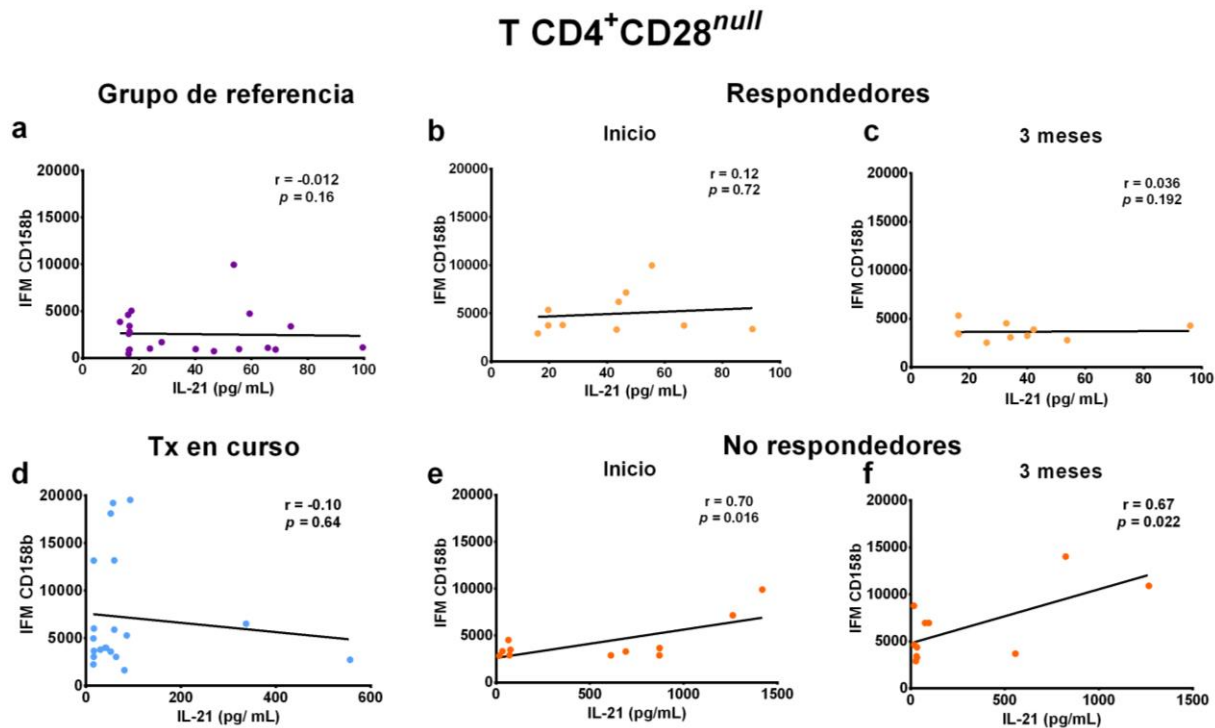
**Figura 13. Niveles de IL-15 e IL-21 en respuesta a tratamiento en pacientes con AR y grupo de referencia.** Los datos representan con los promedios de cada grupo con desviación estándar. Se muestran las concentraciones séricas de (a) IL-15 en grupos de estudio y (b) IL-21 en grupos de estudio. La línea punteada corresponde a las concentraciones de IL-21 al inicio y 3 meses de cada paciente. Tx: Tratamiento. Prueba realizada: prueba de Friedman y Kruskal-Wallis, ambas con corrección de Dunn. Citocinas medidas en pg/mL. \*  $p < 0.05$ .

### 11.4.1 Relación entre los niveles de IL-15 e IL-21 y expresión de CD158b

Considerando la diferencia de niveles séricos de citocinas en la respuesta al tratamiento, se determinó si había asociación entre los niveles séricos de IL-15 e IL-21 con la expresión de CD158b en las poblaciones celulares de los grupos de estudio (Cuadro 21 y 22, Anexo III).

Al correlacionar la expresión de CD158b con los niveles de IL-15, no se encontró diferencia significativa (Cuadro 17, Anexo III). En células NK no se encontró correlación con los niveles de la IL-21 en ninguno de los 4 grupos (Cuadro 18, Anexo III). Sin embargo, se observó correlación positiva entre los niveles de IL-21 y la expresión de CD158b en células T

CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> de los no respondedores (inicio:  $r = 0.70$ ,  $p = 0.016$  y 3 meses:  $r = 0.67$ ,  $p = 0.022$ ) (Figura 14).



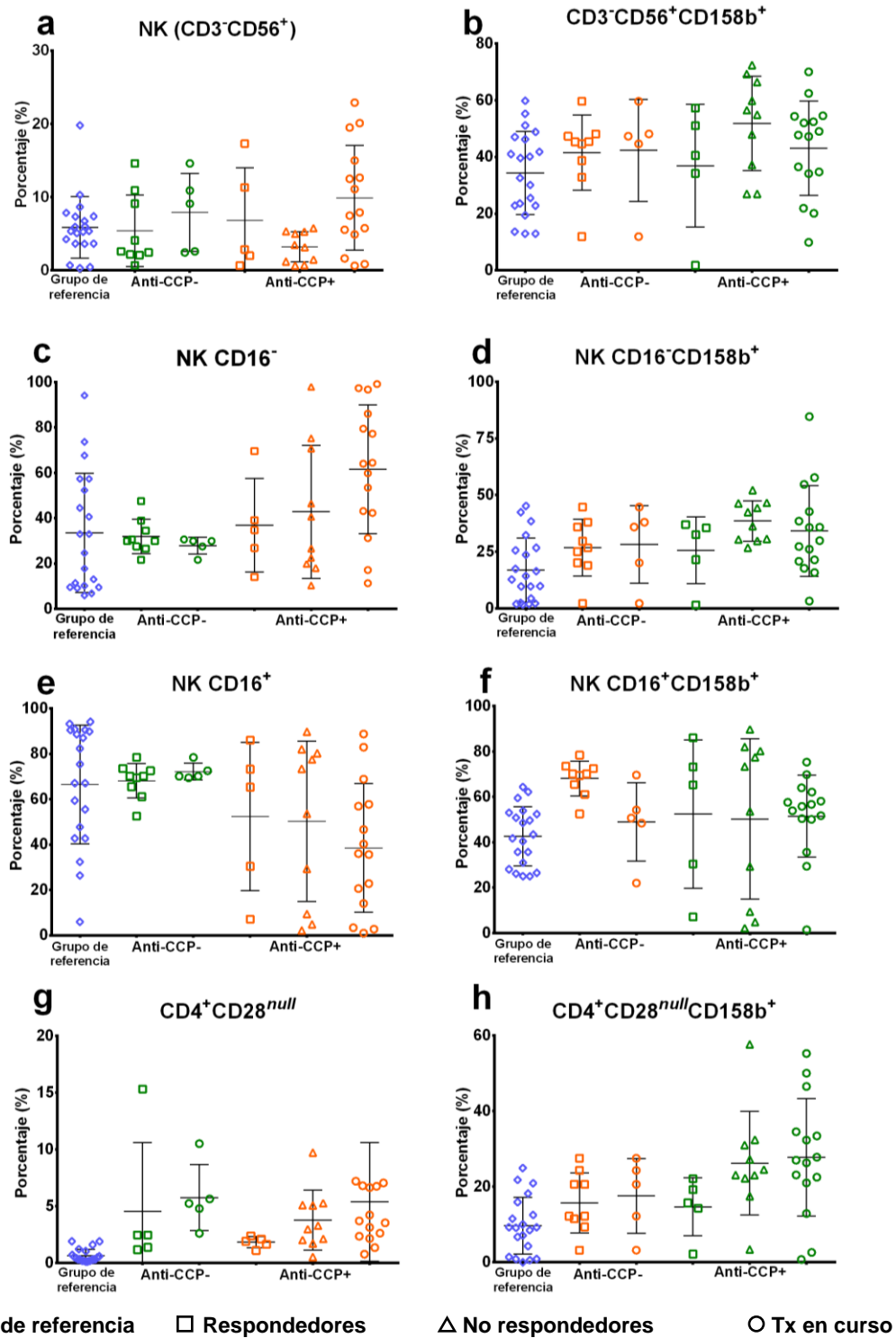
**Figura 14.** Niveles séricos de IL-21 y la expresión CD158b en células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> de pacientes con AR y grupo de referencia.

Grupo de referencia  $n = 20$ , Respondedores  $n = 10$ , no respondedores  $n = 10$ . Correlación entre los niveles de IL-21 y expresión de CD158b en T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>. Se muestran las correlaciones de la expresión de CD158b y niveles de IL-21 sérico de (a) grupo de referencia, (b) respondedores (inicio), (c) respondedores (3 meses de Tx), (d) pacientes con Tx en curso, (e) no respondedores (inicio) y (f) no respondedores (3 meses de Tx). Tx: tratamiento. Prueba de Spearman

## 11.5 Auto-anticuerpos y respuesta al tratamiento

Se analizó la presencia de anti-CCP y FR en el grupo de referencia, pacientes respondedores, no respondedores (inicio y 3 meses) y Tx en curso. Dado que la presencia de los anti-CCP y FR son considerados como factor de mal pronóstico, se estratificó a los pacientes de acuerdo a la presencia de ambos.

En el caso de anti-CCP, el grupo de referencia fueron negativos a anti-CCP; en los respondedores, se encontraron 6 pacientes anti-CCP+ y 4 anti-CCP-; en los no respondedores todos los pacientes fueron anti-CCP+ y en Tx en curso 15 fueron anti-CCP+ y 5 anti-CCP- (Cuadro 1). Se comparó el porcentaje de población celular y la expresión de CD158b. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas (Figura 15).



**Figura 15. Poblaciones celulares de pacientes anti-CCP +/- y grupo de referencia.**

Los datos presentados representan los porcentajes promedios de cada grupo. \*Los valores corresponden al tratamiento inicial. Grupo de referencia n = 20; respondedores n = 10; no respondedores n = 10; pacientes con Tx en curso n = 20. Se muestran los porcentajes de (a) células NK, (b) células NK CD158b<sup>+</sup>, (c) células NK CD16<sup>-</sup>, (d) células NK CD16<sup>-</sup>CD158b<sup>+</sup>, (e) células NK CD16<sup>+</sup>, (f) células NK CD16<sup>+</sup>CD158b<sup>+</sup>, (g) células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> y (h) células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>CD158b<sup>+</sup>. Tx: Tratamiento. Prueba realizada: *Kruskal-Wallis* con corrección de *Dunn*. Valores normales anti-CCP: <5 RU/mL. \* *p* < 0.05.



Así mismo, se evaluó la expresión de CD158b en las poblaciones celulares de los grupos de estudio, estratificados como anti-CCP+ y anti-CCP-. No se encontró en ningún caso diferencia significativa. (Figura 16).

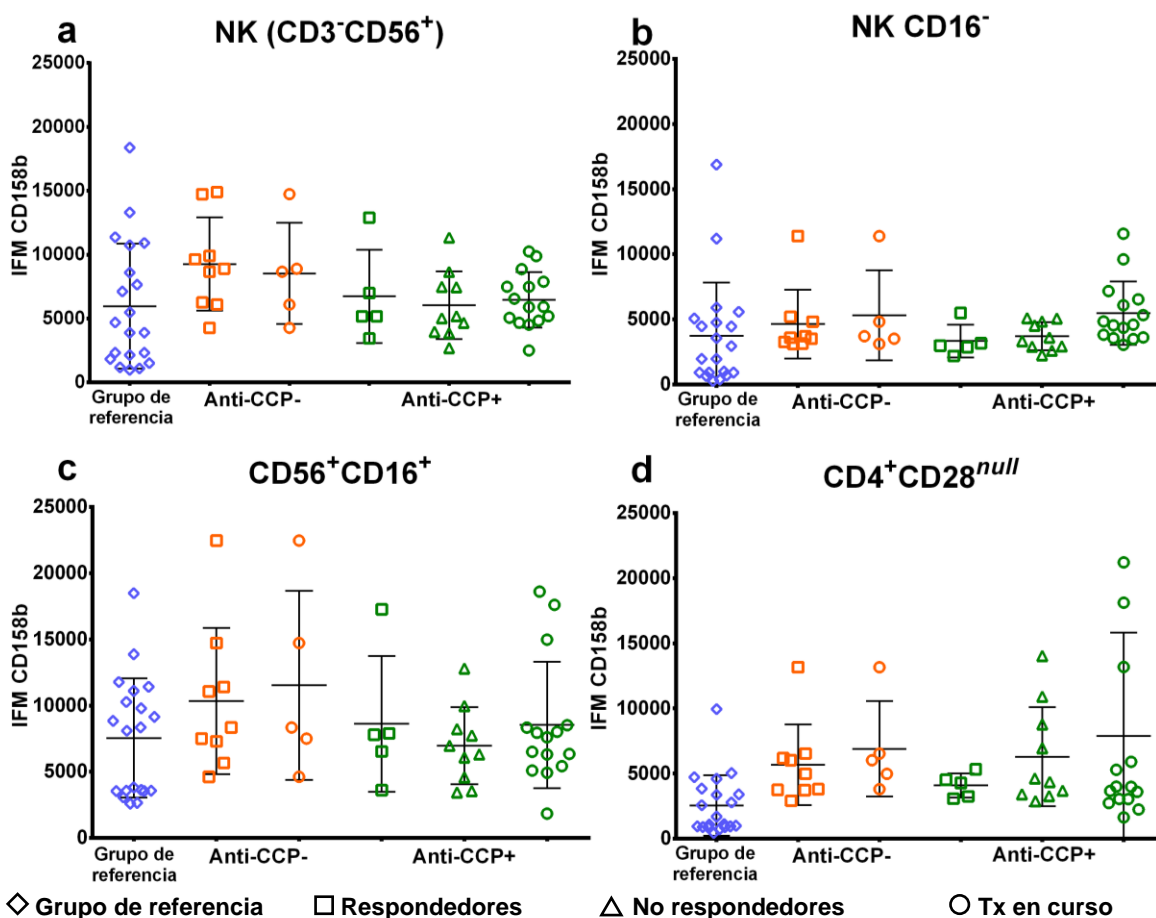
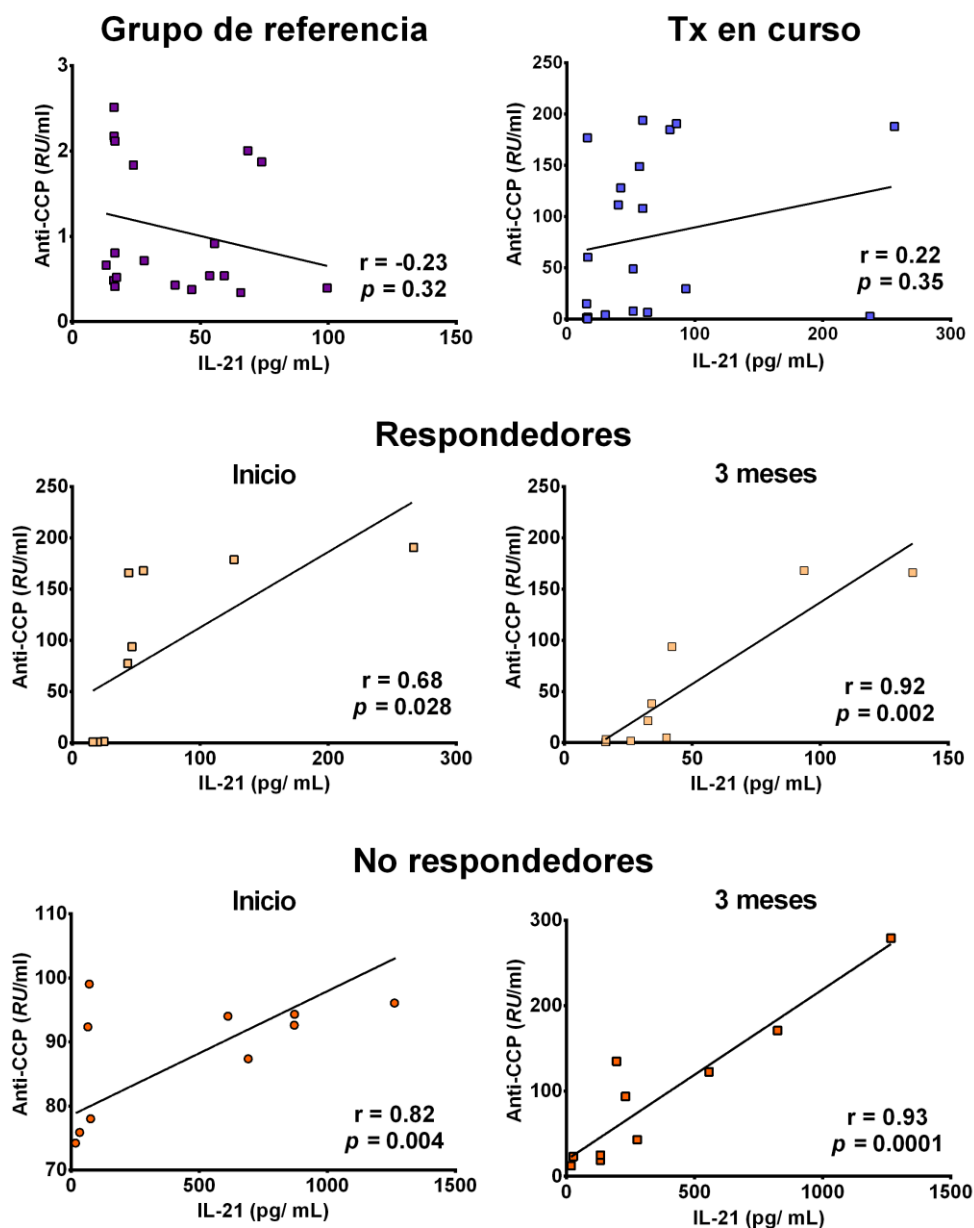


Figura 16. Expresión de CD158b de pacientes anti-CCP +/- y grupo de referencia.

Los datos presentados representan los porcentajes promedios de cada grupo. \*Los valores corresponden al tratamiento inicial. Grupo de referencia n = 20; respondedores n = 10; no respondedores n = 10; pacientes con Tx en curso n = 20. Se muestra la expresión de CD158b en (a) células NK, (b) células NK CD16<sup>-</sup>, (c) células NK CD16<sup>+</sup> y (d) células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>. Tx: Tratamiento. Prueba realizada: *Kruskall-Wallis* con corrección de *Dunn*. Valores normales anti-CCP: <5 RU/mL. \*  $p < 0.05$ .

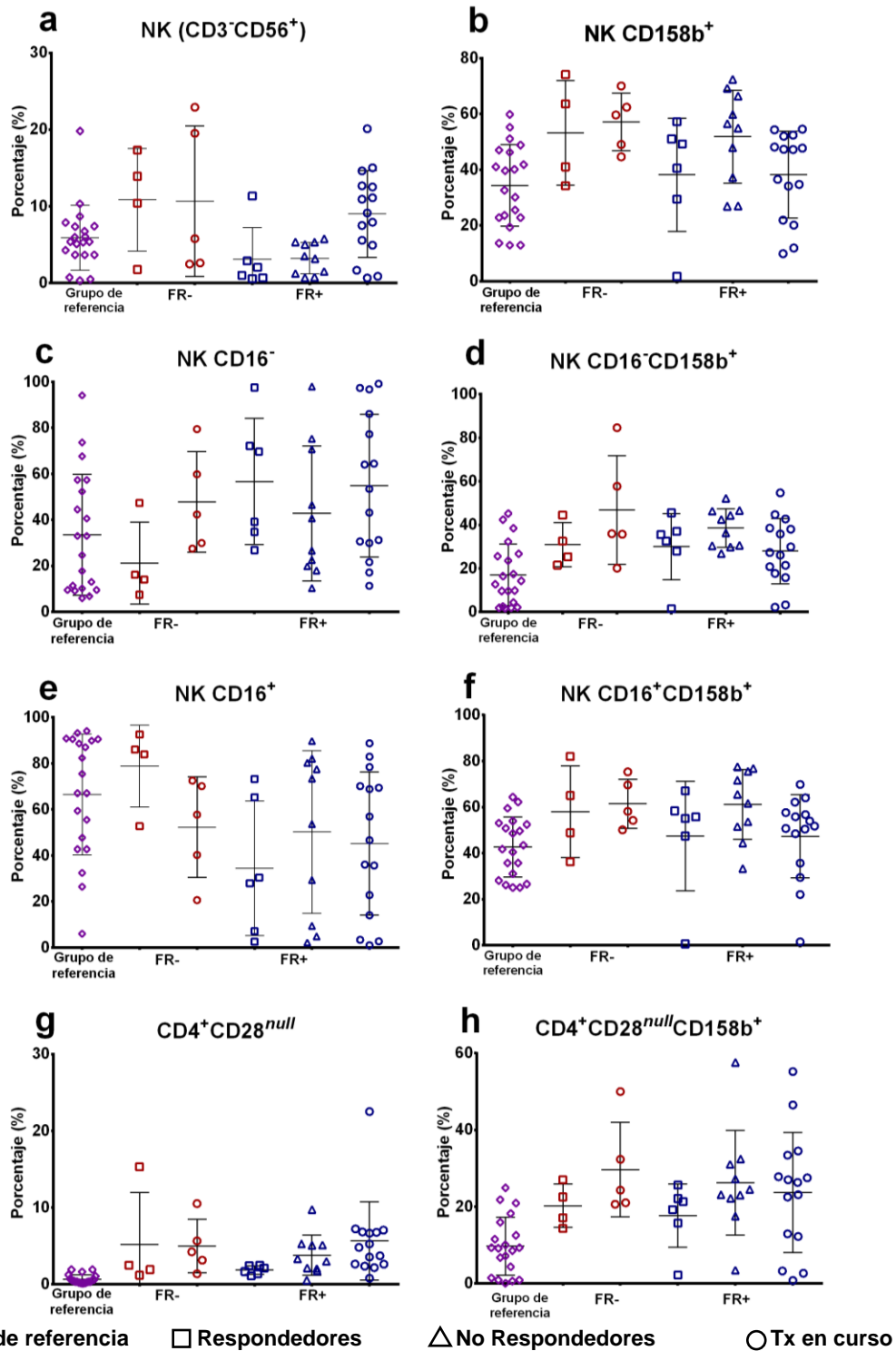
Considerando la diferencia de niveles séricos de IL-21 en la respuesta al tratamiento, se determinó si había asociación entre los niveles séricos de IL-21 con los niveles de anti-CCP. En el grupo de referencia y pacientes con Tx en curso no se encontró correlación. En contraste, en los respondedores se observó una correlación positiva con una  $p$  significativa (inicio:  $r = 0.68$ ,  $p = 0.028$  y 3 meses:  $r = 0.92$ ,  $p = 0.002$ ). Mientras que en el grupo de no respondedores también se encontró una correlación positiva (inicio:  $r = 0.82$ ,  $p = 0.004$  y 3 meses:  $r = 0.93$ ,  $p = 0.0001$ ) (Figura 17).



**Figura 17. Niveles séricos de IL-21 y niveles de anti-CCP de pacientes con AR y grupo de referencia**

Grupo de referencia n = 20, Respondedores n = 10, no respondedores n = 10; pacientes con Tx en curso n = 20. Se muestran las correlaciones entre los niveles de IL-21 y niveles de anti-CCP en grupos de estudio. Tx: tratamiento. RU: relative units. Prueba de Spearman

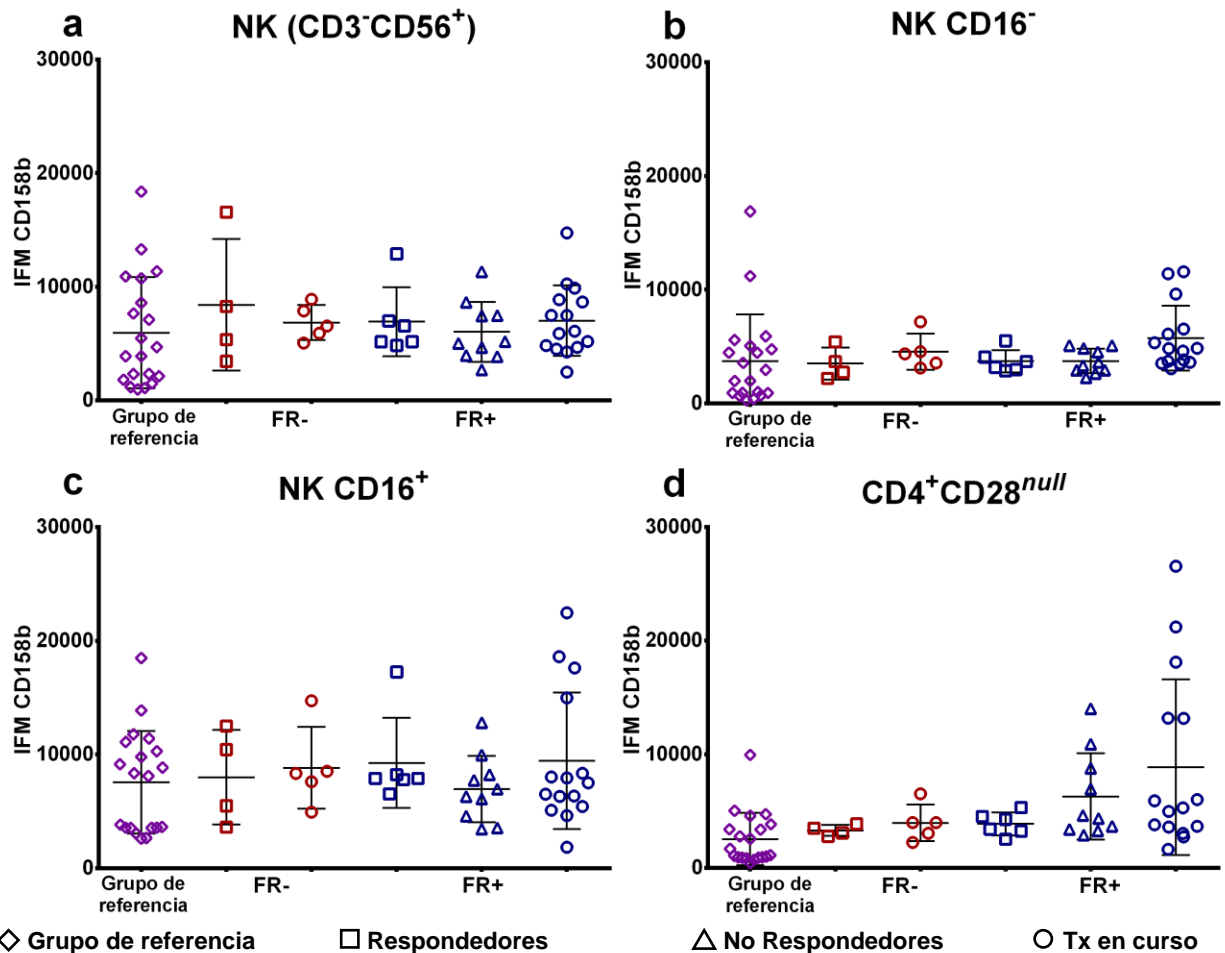
Con respecto al FR, el grupo de referencia fue negativo a FR; en respondedores se encontraron 6 pacientes FR+ y 4 FR-; en no respondedores todos los pacientes fueron FR+ y en Tx en curso 15 fueron FR+ y 5 FR- (Cuadro 1). Se comparó el porcentaje de las poblaciones celulares (NK y T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>) en respondedores y no respondedores. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa (Figura 18).



**Figura 18. Poblaciones celulares de pacientes FR +/- y grupo de referencia.**

Los datos representan los porcentajes promedios de cada grupo. Grupo de referencia n = 20; respondedores n = 10; no respondedores n = 10. Se muestran los porcentajes de (a) células NK, (b) células NK CD158b<sup>+</sup>, (c) células NK CD16<sup>-</sup>, (d) células NK CD16<sup>-</sup>CD158b<sup>+</sup>, (e) células NK CD16<sup>+</sup>, (f) células NK CD16<sup>+</sup>CD158b<sup>+</sup>, (g) células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> y (h) células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>CD158b<sup>+</sup>. Prueba realizada: Kruskal-Wallis con corrección de Dunn. Valores normales FR: <30 RU/mL. \* p < 0.05.

Finalmente, se comparó la expresión de CD158b en células NK y células T CD28<sup>null</sup> de pacientes FR- y FR+ en los grupos de estudio, más no se encontró diferencia significativa (Figura 19).



**Figura 19. Expresión de CD158b en pacientes FR +/- y grupo de referencia.**

Los datos presentados representan medias geométricas de cada grupo. Grupo de referencia n = 20; respondedores n = 10; no respondedores n = 10. Se muestra la expresión de CD158b en (a) células NK, (b) células NK CD16<sup>-</sup>, (c) células NK CD16<sup>+</sup> y (d) células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>. Tx: Tratamiento. Prueba realizada: *Kruskal-Wallis* con corrección de *Dunn*. Valores normales FR: <30 RU/mL. \*  $p < 0.05$ .

Al igual que con anti-CCP, se determinó si había asociación entre los niveles séricos de IL-21 con los niveles de FR. Tanto en el grupo de referencia como en pacientes con Tx en curso no se encontró correlación. En contraste, en los respondedores se observó una correlación positiva con IL-21 (inicio:  $r = 0.69$ ,  $p = 0.028$  y 3 meses:  $r = 0.64$ ,  $p = 0.043$ ). Mientras el grupo de no respondedores no se encontró correlación (Figura 20).

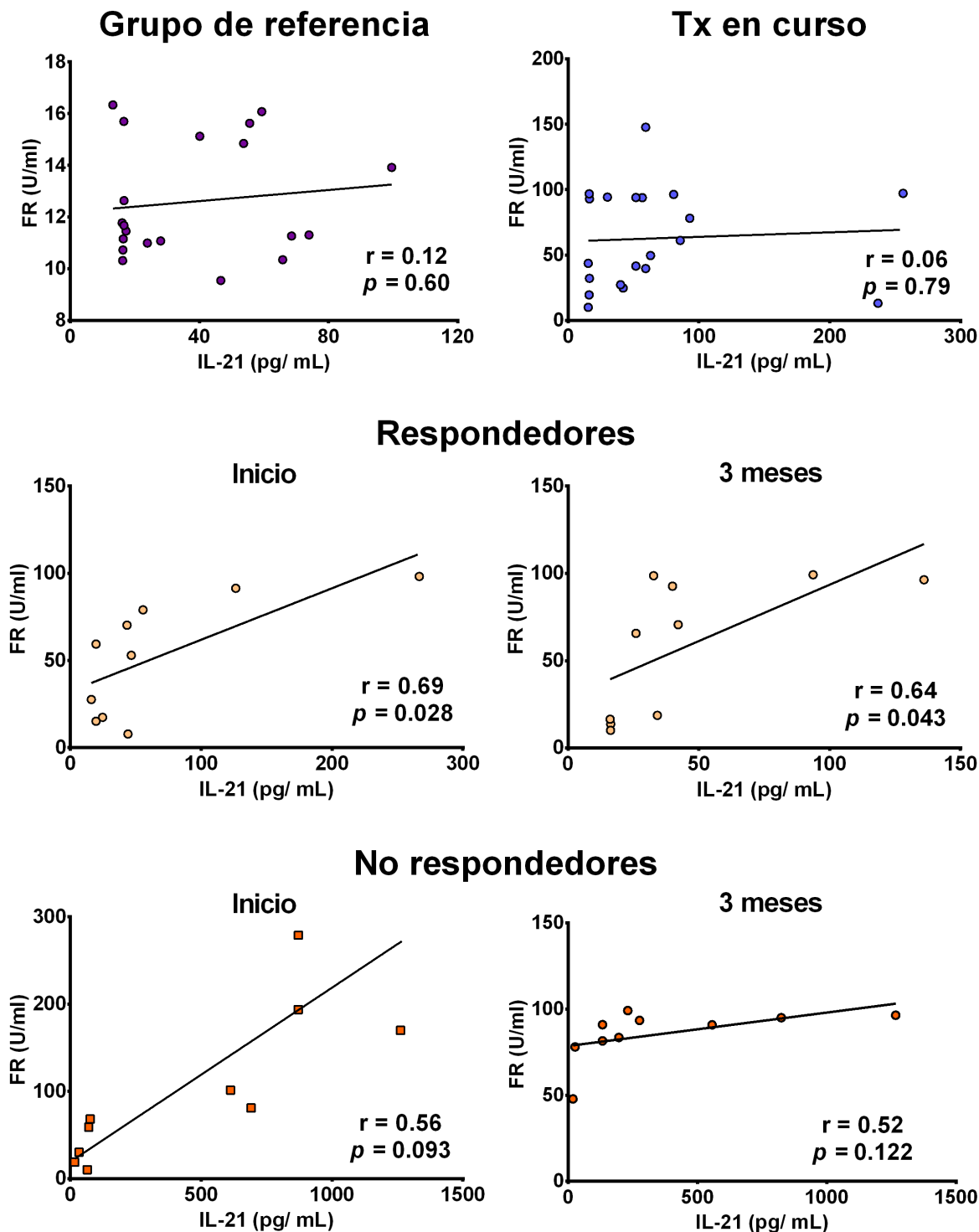


Figura 20. Niveles séricos de IL-21 y niveles de factor reumatoide de pacientes con AR y grupo de referencia. Grupo de referencia n = 20, Respondedores n = 10, no respondedores n = 10; pacientes con Tx en curso n = 20. Se muestran las correlaciones entre los niveles de IL-21 y niveles de anti-CCP en grupos de estudio. Tx: tratamiento. Prueba de Spearman

---

## 12 DISCUSIÓN

Los *DMARDs* son fármacos considerados como el tratamiento básico para el manejo de la artritis reumatoide, ya sea en monoterapia o terapia combinada. Pese a las recomendaciones existentes en su uso, los pacientes no responden de forma similar, lo que ocasiona que algunos pacientes no presenten una mejoría o presenten efectos adversos.

La complejidad en la patogénesis de la enfermedad y las manifestaciones clínicas que presenta cada paciente contribuyen a la variabilidad en la respuesta al tratamiento. Las células inmunes involucradas en la enfermedad, como las células NK y linfocitos T, podrían influir en la respuesta a tratamiento. En estas poblaciones celulares, se expresan los receptores KIR, los cuales regulan su activación y función celular.

En este estudio se evaluaron los porcentajes de las poblaciones celulares NK y T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> y su expresión de CD158b (receptores KIR2DL2, KIR2DS2 y KIR2DL3) en un grupo de individuos sanos y en pacientes con AR, donde se incluyeron pacientes vírgenes a tratamiento, su seguimiento a 3 meses (tratados con MTX) y pacientes con tratamiento en curso (pacientes con más de un año de tratamiento). Esto con el objetivo de determinar la asociación del tratamiento con *DMARDs* de pacientes con AR y la eficiencia del mismo (respuesta) con la expresión de KIR2DL2, KIR2DS2 y KIR2DL3 de las células NK y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>

Al caracterizar los grupos de respondedores y no respondedores, se observó que ambos grupos presentaban diferencias en sus características clínicas. El grupo de respondedores estuvo constituido, en su mayoría, por pacientes en etapas tempranas de la enfermedad, Esto coincide con trabajos previos donde relacionan un mejor resultado al iniciar el tratamiento en etapas tempranas (Robustillo Villarino and Rodriguez Moreno 2011, Romao, Canhao et al. 2013).

En cambio, los no respondedores fue un grupo constituido en su mayoría por pacientes con una AR establecida, seropositivos a anti-CCP y FR; altos valores de VSG y proteína C reactiva; los cuales son considerados como factores de mal pronóstico. Estas características están asociadas con una AR más agresiva, y con la predisposición a presentar un mayor daño articular y limitación funcional (Scott, Lewis et al. 2013, Albrecht and Zink 2017). Aunque

este grupo presentó una disminución en la actividad de la enfermedad, ésta fue menor comparada con los respondedores; lo cual sugiere que los pacientes que presentan factores de mal pronóstico requieren de un tratamiento inicial más agresivo (terapia combinada) para controlar el progreso de la enfermedad.

Además de lo anterior, las diferencias entre las poblaciones celulares (NK y T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>), expresión de CD158b y niveles de citocinas (IL-15 e IL21) pudieran reflejar su posible asociación con la respuesta al tratamiento. Para ello se realizó el análisis de estos factores de acuerdo a los siguientes puntos de interés: (1) determinar si hay diferencia entre pacientes sin Tx, pacientes con Tx y grupo de referencia, (2) comparar entre el grupo de respondedores y no respondedores y (3) comparación entre los valores al inicio del estudio y a los 3 meses de seguimiento.

En general, los pacientes con AR presentaron mayores porcentajes de células NK comparado con el grupo de referencia, pese a que no se observó diferencia significativa, nos sugiere que esta población celular participa en la inmunopatología de la enfermedad. Previamente se ha reportado la participación de las células NK en AR, donde presentan una función reguladora de las respuestas adaptativas de las células T (Shi and Van Kaer 2006, Ahern and Brennan 2011). En etapas iniciales de autoinmunidad, se ha reportado que existe un aumento de la población de células NK, ya que estas permiten la supervivencia de las células T, mediante maduración de células dendríticas y la activación de monocitos, lo que lleva la producción de citocinas como: IL-2, IL-15 e IL-18 (Ahern and Brennan 2011, Shi and Zhou 2011). Sin embargo, conforme avanza la enfermedad, la población de células NK disminuye; esto puede ser un mecanismo para evitar la regulación de las respuestas adaptativas, ya que las células NK pueden eliminar células T activadas y células presentadoras de antígeno (Rabinovich, Li et al. 2003, Shi and Van Kaer 2006).

Para el análisis con la población celular T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>, fue necesario considerar que el aumento de esta población en circulación está directamente relacionado con la edad del individuo (Dumitriu 2015, Maly and Schirmer 2015). Por lo tanto, los individuos del grupo de referencia se parearon en edad y género de los pacientes respondedores y no respondedores para evitar el sesgo ocasionado por la edad.

En nuestros resultados se observó el aumento de las células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en el total de pacientes con AR. Esto coincide con otros estudios, en donde previamente se había reportado que, en AR, la población T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> se encuentra elevada en circulación (Dejaco, Duftner et al. 2010, Dumitriu 2015, Maly and Schirmer 2015). Este aumento en AR ya se había reportado por Ramírez de los Santos en el 2014, sin embargo, la población de AR en ese estudio incluía pacientes con y sin tratamiento (Ramírez-de los Santos, 2014). Por lo tanto, de acuerdo al aumento de T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> CD158b<sup>+</sup> en vírgenes a tratamiento, nos sugiere que estas células CD158b<sup>+</sup> participan en la inmunopatología de la enfermedad.

A los 3 meses de Tx se encontraron cambios en los porcentajes de células NK y T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en los pacientes respondedores y no respondedores. Los respondedores presentaron aumento de células NK CD158b<sup>+</sup> y una disminución de T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>, mientras que en no respondedores se pudo observar lo contrario, la disminución de NK CD158b<sup>+</sup> y el aumento de T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> y T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>CD158b<sup>+</sup>, lo que quiere decir que el tratamiento puede influir en la frecuencia de ambas poblaciones celulares. En células NK, Conigliaro en el 2014, observó que el uso de biológicos (etanercept – anti-TNF- $\alpha$ ) en pacientes con AR puede restablecer la frecuencia y función citotóxica de las células NK periféricas (Conigliaro, Triggianese et al. 2014). Mientras en poblaciones T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> Bryl *et al.*, ha reportado que el uso de anti-TNF en pacientes con AR disminuye los porcentajes de esta población celular (Bryl, Vallejo et al. 2005).

Debido a las interacciones reportadas entre células NK y células T por Liu *et al.*, Shi *et al.* Ahern *et al.* y Popko *et al.*; en donde en condiciones autoinmunes, ambas poblaciones pueden afectarse tanto en frecuencia como en función, se correlacionaran sus porcentajes celulares (Liu, Van Kaer et al. 2006, Shi and Van Kaer 2006, Ahern and Brennan 2011, Popko and Gorska 2015).

En general, en todos los grupos se encontró una correlación positiva entre células NK y células T, lo que coincide con la función reguladora de las células NK previamente mencionada. Sin embargo, al clasificar a esta población de acuerdo al CD16, se pudo observar diferente distribución de la población total de células NK. Mientras que en el grupo de referencia y pacientes con Tx en curso se puede observar que hay mayor proporción de células NK CD16<sup>+</sup>; en no respondedores la distribución es contraria, y predomina la población



CD16<sup>-</sup>. De acuerdo a Crome *et al.*, las células NK CD16<sup>+</sup> son una subpoblación de células NK que presentan una alta actividad citotóxica y expresan KIR, esta misma población está asociada con la modulación negativa de las células T. Mientras que las células NK CD16<sup>-</sup>, es una subpoblación que se caracteriza por la producción de citocinas, mismo que está relacionada con la promoción de la supervivencia de células T activadas (Shi and Zhou 2011, Crome, Lang et al. 2013, Popko and Gorska 2015).

Posteriormente, se evaluó la expresión de CD158b en las poblaciones celulares de los grupos de estudio. La expresión de CD158b en células NK fue menor en no respondedores, esta disminución de expresión de CD158 en NK ocurrió principalmente en la subpoblación de NK CD16<sup>+</sup>, y como previamente se mencionó, es una subpoblación que expresa KIR, el cual media su activación (Crome, Lang et al. 2013). En enfermedades autoinmunes (como AR), se ha reportado que las células NK circulantes, principalmente CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>, se encuentran en bajos porcentajes y con una función citotóxica comprometida, este fenómeno es conocido como degeneración de las células NK (Shi and Van Kaer 2006). Por lo que es posible que pudiera deberse a la disminución de la expresión de CD158b.

Al mismo tiempo, se encontró una mayor expresión de CD158b en células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en los pacientes con AR. Esto coincide con lo observado por Namekawa en el 2000, donde encuentran una sobreexpresión de KIR en esta misma población celular en pacientes con AR, donde es utilizado como coestimulador para la activación de esta población celular (Namekawa, Snyder et al. 2000, van Bergen and Koning 2010).

Debido a que el anticuerpo anti-CD158b, no permite discernir entre la expresión de KIR2DL2, KIR2DS2 y KIR2DL3, se identificaron los genes y genotipos *KIR2DL2*, *KIR2DS2* y *KIR2DL3*, ya que así nos permitió estimar y/o inferir cuales genes se podrían estar expresando en las poblaciones celulares de interés. Esto debido a que previamente se ha reportado que los genes *KIR2DL2*, *KIR2DS2* y *KIR2DL3* se han asociado con AR, sus manifestaciones extraarticulares y, en el caso del genotipo *KIR2DL2/S2*, con la respuesta al Tx en diferentes poblaciones, incluyendo el occidente de México (Yen, Moore et al. 2001, Majorczyk, Pawlik et al. 2007, McGeough, Berrar et al. 2012, Ramirez-De los Santos, Sanchez-Hernandez et al. 2012, Majorczyk, Pawlik et al. 2014, Prakash, Alam et al. 2014, Velarde-de la Cruz, Sanchez-Hernandez et al. 2016).

Con respecto a nuestros resultados, se observó una tendencia en los respondedores al genotipo *KIR2DL2+/S2+/L3+* y en no respondedores al genotipo *KIR2DL2+/S2-/L3*, mas no encontramos diferencia significativa, posiblemente porque el tamaño de muestra es menor comparado con el tamaño de muestra de los estudios previamente mencionados. Posteriormente, se evaluó si existía diferencias en la expresión de CD158b entre los diferentes genotipos, pero no se encontró diferencia significativa por lo que es posible que otros factores pueden afectar la expresión de CD158b.

Por lo anterior, se evaluaron otros factores que están involucrados con la expresión de KIR y participan en la inmunopatología de la AR, como IL-15 e IL-21. IL-15 es una glucoproteína compuesta por 114 aminoácidos producido principalmente por células dendríticas y monocitos, participa en la proliferación de NK y diferenciación de células T además del mantenimiento de las células de memoria T CD8<sup>+</sup>. En AR, se ha observado que IL-15 induce la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , además de promover el reclutamiento y acumulación de células T en articulación (Waldmann 2005, Yuan, Hu et al. 2011, Yang, Xu et al. 2015).

Mientras que IL-21, es un miembro de la familia de citocinas tipo I, al igual que IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15; producida principalmente por células T foliculares, Th17 y NKT. En circunstancias normales, IL-21 participa en la activación y maduración de las células NK, en la diferenciación de células T; además en la proliferación y maduración de células B y su maduración a células plasmáticas. IL-21 presenta un papel clave en la patogénesis y progresión de la AR, desde promover la expansión y diferenciación de las poblaciones Th17 y T foliculares; suprimir la expresión de Foxp3 y su participación en la maduración en células B y producción de autoanticuerpos (Gharibi, Majidi et al. 2016, Dinesh and Rasool 2017).

Dicho esto, se cuantificaron los niveles séricos de IL-15 e IL-21 en grupo de referencia, pacientes respondedores, no respondedores y pacientes con Tx en curso. Al inicio, los pacientes no respondedores presentaron mayores niveles de IL-21 comparado con los demás grupos; lo que coincide con Niu *et al.* y Dinesh, *et al.*, quienes han reportado altos niveles de IL-21 sérica en pacientes con AR. (Niu, He et al. 2010, Dinesh and Rasool 2017). En nuestros resultados se observaron altos valores iniciales de IL-21 en los pacientes no respondedores comparados con los pacientes respondedores; estos valores se mantuvieron

altos a los 3 meses de Tx comparados con los pacientes con Tx en curso, lo que sugiere una relación con la eficiencia del tratamiento.

Por lo tanto, dado los niveles encontrados de IL-21 en los pacientes con AR, además de la relación de esta citocina con la expresión de KIR y la producción de autoanticuerpos, se optó por correlacionar sus niveles séricos con la expresión de CD158b en las poblaciones celulares de interés y con los niveles de autoanticuerpos en los grupos de estudio.

En células NK no se observó correlación entre la expresión de CD158b y los niveles de IL-21 de los grupos de estudio. Sin embargo, estudios realizados por de Rham *et al.* y Li *et al.* han reportado que altas concentraciones de IL-21 disminuyen la capacidad citotóxica, su viabilidad y la expresión de receptores como NKG2D y KIR (de Rham, Ferrari-Lacraz *et al.* 2007, Li, Ye *et al.* 2015).

Mientras, en células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> se encontró una correlación positiva de la expresión de CD158b con los niveles séricos de IL-21 en pacientes no respondedores tanto al inicio como a los 3 meses de tratamiento. Hasta la fecha no hay estudios que asocien los niveles de IL-21 con la expresión de CD158b en pacientes con Tx. Sin embargo, Ramírez-de los Santos *et al.* 2014, observó el aumento de la expresión de CD158b en esta misma población en pacientes con AR (con y sin Tx), así como el aumento de las poblaciones T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>IL-21R<sup>+</sup>, lo que sugiere, en conjunto con nuestros resultados, la posible influencia de IL-21 en la expresión de CD158b en esta población celular (Ramírez-de los Santos *et al.* 2014).

Con base en los resultados de las poblaciones celulares es claro que el tratamiento influye en las interacciones entre células T y NK. En AR, las células NK pueden presentar un papel dual: promoviendo el progreso de la AR y a su vez como un modulador negativo (Poggi and Zocchi 2014, Popko and Gorska 2015). Por un lado, las células NK pueden inhibir la respuesta de células T mediante la producción de citocinas (IL-10) y la interacción directa, ya sea estimulando o destruyendo a las células T autorreactivas así como células presentadoras de antígeno, funciones relacionadas en NK CD16<sup>+</sup> (Shi and Zhou 2011, Crome, Lang *et al.* 2013, Popko and Gorska 2015).

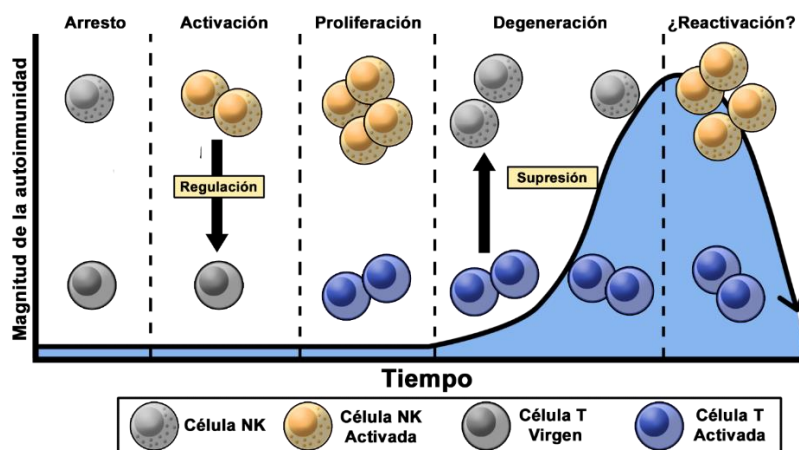
En etapas iniciales de la autoinmunidad, se ha reportado que las células NK promueven las respuestas de células T mediante la maduración de APC, la expresión de coestimuladores de células T y B; activación de monocitos y producción de citocinas (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-22);

estas funciones están asociadas con células NK CD16<sup>+</sup> (Shi and Van Kaer 2006, Ahern and Brennan 2011, Shi and Zhou 2011, Crome, Lang et al. 2013, Popko and Gorska 2015).

Sin embargo, en AR se ha observado que las células NK circulantes presentan una disminución (mayormente CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) y una función citotóxica deficiente (degeneración de células NK), esto ocasiona que favorezca la progresión de la enfermedad (Liu, Van Kaer et al. 2006, Shi and Zhou 2011).

En respondedores, es posible que aún no ocurra la degeneración de células NK o se encuentra en etapas iniciales. Debido a que la mayoría de los respondedores son de etapa temprana, no se encontró disminución de las células NK. Previamente, Shi y Van Kaer, en el 2006 sugirieron que un estímulo exógeno, pudiera revertir la degeneración de las células NK, como el uso de fármacos (Shi and Van Kaer 2006). Esto sugiere que, en pacientes respondedores, el tratamiento permita la regeneración de las células NK y estas a su vez, participen en la disminución de la población de T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> (Figura 21).

Mientras que, en no respondedores, dado el aumento de T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> y disminución de células NK, es claro que la monoterapia con MTX no es estímulo suficiente para ocasionar la regeneración de la población de células NK; esto sugiere que, en no respondedores, algún factor está interfiriendo con esta regeneración de células NK, pese al uso del tratamiento, y además promueva al aumento de la población T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> y de su expresión de CD158b (Figura 21).



**Figura 21. Degeneración de las células NK.**

En el caso de AR, se ha reportado una menor cantidad de células NK CD56<sup>dim</sup> en sangre periférica con una capacidad citotóxica comprometida, proceso denominado degeneración de las células NK. Este fenómeno posiblemente sirva como uno de los mecanismos utilizado por los linfocitos T CD4 autorreactivos para controlar el proceso autoinmune.

---

Nuestros resultados indican que posiblemente, este factor sea la IL-21, ya que una diferencia importante entre respondedores y no respondedores es precisamente los niveles altos de IL-21. En primera instancia, todos los pacientes fueron seropositivos a anti-CCP y FR, mismos que fueron correlacionados con los niveles de IL-21, esto pudiera explicarse debido a su participación en la diferenciación a T foliculares, la maduración de células B y con la producción de autoanticuerpos (Dinesh and Rasool 2017). Por lo que los niveles de autoanticuerpos son un reflejo de los niveles de IL-21 y por lo tanto pudiera ser utilizado como un indicador de la respuesta al tratamiento.

Por otra parte en AR, se ha reportado que las células NK CD56<sup>dim</sup> periféricas, sufren una disminución de su frecuencia y presentan función citotóxica comprometida (degeneración de las células NK), y que es mediado por células T autorreactivas mediante altas secreciones de IL-21 (> 50 pg/ml) (Shi and Van Kaer 2006, Shi and Zhou 2011, Fogel, Yokoyama et al. 2013, Li, Ye et al. 2015). Entre las células T que producen IL-21 se encuentran las células Th17, las células T foliculares y las células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>; por lo que es posible que la producción IL-21 mediada por T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en periferia y Th17 en articulación ocasione la degeneración de la células NK (Niu, He et al. 2010, Ahern and Brennan 2011, Poggi and Zocchi 2014, Dumitriu 2015, Maly and Schirmer 2015, Dinesh and Rasool 2017).

En un tercio de los pacientes con AR, aparecen las células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> y con mayor frecuencia en sangre periférica que en articulación. En ambos tejidos, se sugiere que esta población celular realiza diferentes funciones: en articulación se observado que puede producir altas concentraciones de IL-17, IL-21 y TNF- $\alpha$ . Hasta el momento esta población se encuentra directamente asociada con la severidad y con el desarrollo de manifestaciones extraarticulares como la formación de nódulos subcutáneos y vasculitis (Dumitriu 2015, Maly and Schirmer 2015).

Por lo tanto, en pacientes no respondedores, posiblemente la disminución de la población de células NK, sea mediada por células T autorreactivas productoras de IL-21, lo cual promueve la expresión CD158b en T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> y conduce a una continua producción de IL-21, que se manifiesta en la mala respuesta al tratamiento (Rabinovich, Li et al. 2003, Liu, Van Kaer et al. 2006, Shi and Van Kaer 2006, Shi and Zhou 2011).

Dado los resultados encontrados en pacientes respondedores, no se debe de descartarla posible influencia del MTX en la expresión de CD158b en las poblaciones celulares NK y T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>. El MTX es un análogo al tetrahidrofolato, el cual está involucrado con la vía de síntesis de *nov*o de las purinas y pirimidinas del DNA y RNA, además de participar en el ciclo metionina homocisteína, en el cual contribuye con un grupo metil, necesario para la metilación del DNA, RNA y otros (Cutolo, Sulli et al. 2001, Malaviya, Sharma et al. 2010).

Una vez administrado el MTX, al igual que los folatos, el 3 - 12% de este es hidroxilado en el hígado y circula como 7-OH-MTX. El MTX extracelular es introducido a la célula a través los receptores de folato (FR $\alpha$  y FR $\beta$ ), una porción del MTX y 7-OH-MTX es metabolizado a poliglutamato-MTX (MTX-glu), un derivado de vida larga. El MTX y MTX-glu sustituyen a los folatos como sustrato para la enzima al dihidrofolato reductasa (DHFR) y como cofactor de las enzimas timidilato sintetasa (TS) y AICAR transformilasa, lo que induce la inhibición de su actividad. El efecto del MTX en el individuo varía de acuerdo a la dosis; en dosis bajas (7.5 – 30 mg/sem; abreviado como LDMTX) causan un efecto antiinflamatorio, mientras que altas dosis (>500 mg/sem; abreviado HDMTX) asociado con un efecto antiproliferativo (Malaviya, Sharma et al. 2010).

En el caso de AR, las dosis terapéuticas óptimas son de 15 – 25 mg/sem; bajo estas concentraciones, el MTX y sus derivados inhiben la actividad de la enzima AICAR transformilasa, lo que afecta en la formación de 5-formil-AICAR. La inhibición de esta vía metabólica resulta en el aumento de niveles intercelulares de adenosina, las cuales presentan diversos efectos que disminuyen la inflamación: (1) disminución de la secreción de IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-1, leucotrieno B4 y óxido nítrico; (2) promueve la producción de mediadores antiinflamatorios IL-10 y IL-1ra; (3) inhibición de la síntesis de colagenasa; (4) resolución de la inflamación mediante la regulación negativa de activación de macrófagos y cambio de respuesta Th1 a Th2. (5) Reducción de enzimas de ciclooxigenasa, lipoxigenasa y metaloproteinasa de matriz (Cutolo, Sulli et al. 2001, Malaviya, Sharma et al. 2010). Estos efectos antiinflamatorios sugieren, que la monoterapia con MTX es más efectivo en pacientes con AR temprana, debido a que en estas etapas la AR esta las células T presentan un perfil Th1, inhibiendo la mayoría de las citocinas de este perfil y favoreciendo una respuesta tipo Th2.

Por otro lado, la expresión de KIR es regulado por la metilación del DNA y la expresión de factores de transcripción Sp1, Myc y ETs (Liu, Kuick et al. 2009). En AR se ha reportado que las células T presentan hipometilación de sitios asociados con la respuesta inmune (de Andres, Perez-Pampin et al. 2015). Entre estos sitios posiblemente la región de KIR, lo que ocasiona la expresión del CD158b en la población T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>. Uno de los mecanismos de acción del MTX, es promover la producción de grupos metil, lo que promueve la metilación del DNA en células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> (de Andres, Perez-Pampin et al. 2015). Por lo que posiblemente en respondedores a tratamiento, el MTX promueva la metilación de la región de KIR en células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>, lo que inhibe la expresión de CD158b que finalmente lleva a la buena respuesta al tratamiento.

Aun así, es necesario realizar más estudios al respecto para determinar la participación del MTX en células NK y T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>, y en la expresión de CD158b, además de analizar el antagonismo de la IL-21 con la respuesta al tratamiento. También es importante distinguir la participación de los 3 receptores (KIR2DL2, KIR2DS2 y KIR2DL3) tanto en la patología como en la respuesta a tratamiento. Esto con el objetivo de tener una mejor comprensión de la inmunopatología de la enfermedad, la influencia del tratamiento en las poblaciones celulares de interés y expresión de CD158, lo que permite el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos que permitan un tratamiento más personalizado y con la probabilidad de mejorar la respuesta a éste.



---

## 13 CONCLUSIONES

Dado los resultados obtenidos al evaluar las poblaciones en células NK y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> y la expresión de CD158b con la respuesta al tratamiento en pacientes con AR se puede concluir:

1. Los pacientes con AR presentan mayores porcentajes de células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> y expresión de CD158b<sup>+</sup> que individuos sanos
2. Los pacientes con AR vírgenes a Tx presentan una menor expresión de CD158b en células NK que sujetos sanos
3. En pacientes con AR respondedores a Tx se observaron mayores porcentaje de células NK y un incremento en la expresión de CD158b a los 3 meses de Tx
4. En respuesta a tratamiento, no se encontró asociación de los niveles de anti-CCP, factor reumatoide e IL-15 con la expresión de CD158b y las poblaciones celulares de pacientes con AR
5. En no respondedores se observaron altas concentraciones de IL-21 al inicio y 3 meses de tratamiento
6. En los no respondedores a tratamiento se observó asociación entre IL-21 y la expresión de CD158b en células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en periferia

En pacientes respondedores, el tratamiento con MTX influye en la disminución de células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> y la expresión de CD158b, lo que lleva a la buena respuesta. Mientras en no respondedores, la participación de IL-21 promueve la expresión de CD158b en las células T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>, esto influye en su supervivencia y activación, lo que implica su participación en la inmunopatología de la artritis reumatoide y en la no respuesta al tratamiento con MTX.



## 14 LIMITACIONES

El anti-CD158b detecta simultáneamente los receptores KIR2DL2, KIR2DS2 y KIR2DL3, por lo que no permitió distinguir cuál de los tres receptores se está expresando.

## 15 PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos se abre la posibilidad a futuros trabajos referentes a los genes y receptores KIR y AR como son:

1. Determinar la participación del MTX en la expresión de CD158b en las células NK y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> de sangre periférica de pacientes con AR; y así tener una mejor comprensión de la influencia del tratamiento con la expresión de receptor
2. Evaluar la expresión de receptores KIR en de células NK y linfocitos T de sangre periférica (CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>) y su relación con la respuesta a DMARDs en pacientes con AR a los 6 y 12 meses (largo plazo)
3. Determinar la actividad citotóxica de las células NK y T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en pacientes vírgenes a tratamiento y con ello determinar cómo afecta el tratamiento a la actividad citotóxica de estas poblaciones celulares
4. Evaluar el mRNA de *KIR2DL2*, *KIR2DS2* y *KIR2DL3* en pacientes con AR respondedores y no respondedores a MTX a 6 y 12 meses, para distinguir la influencia de cada receptor en la respuesta a tratamiento

---

## 16 BIBLIOGRAFÍA

1. Ahern, D. J. and F. M. Brennan (2011). "The role of Natural Killer cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: major contributors or essential homeostatic modulators?" Immunol Lett **136**(2): 115-121.
2. Albrecht, K. and A. Zink (2017). "Poor prognostic factors guiding treatment decisions in rheumatoid arthritis patients: a review of data from randomized clinical trials and cohort studies." Arthritis Res Ther **19**(1): 68.
3. Aletaha, D., T. Neogi, A. J. Silman, J. Funovits, D. T. Felson, C. O. Bingham, 3rd, N. S. Birnbaum, G. R. Burmester, V. P. Bykerk, M. D. Cohen, B. Combe, K. H. Costenbader, M. Dougados, P. Emery, G. Ferraccioli, J. M. Hazes, K. Hobbs, T. W. Huizinga, A. Kavanaugh, J. Kay, T. K. Kvien, T. Laing, P. Mease, H. A. Menard, L. W. Moreland, R. L. Naden, T. Pincus, J. S. Smolen, E. Stanislawska-Biernat, D. Symmons, P. P. Tak, K. S. Upchurch, J. Vencovsky, F. Wolfe and G. Hawker (2010). "2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative." Arthritis Rheum **62**(9): 2569-2581.
4. Banos-Hernandez, C. J., J. E. Navarro-Zarza, I. Parra-Rojas, M. Vazquez-Villamar, J. Ramon Padilla-Gutierrez, Y. Valle, Z. Reyes-Castillo, N. Magdalena Torres-Carrillo, S. Garcia-Arellano, L. M. Brennan-Bourdon and J. F. Munoz-Valle (2017). "PADI4 polymorphisms and the functional haplotype are associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility: A replication study in a Southern Mexican population." Hum Immunol **78**(9): 553-558.
5. Blanco, F. J., J. Ballina, J. Carbonell, E. Martin-Mola, J. Tornero, E. Ramirez and J. Galvan (2011). "[Descriptive study of the use of DMARD in patients with rheumatoid arthritis or persistent arthritis who start drug treatment in Spain (FIRST)]." Reumatol Clin **7**(2): 88-93.

6. Boissier, M. C., L. Semerano, S. Challal, N. Saidenberg-Kermanac'h and G. Falgarone (2012). "Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction." J Autoimmun **39**(3): 222-228.
7. Bryl, E., A. N. Vallejo, E. L. Matteson, J. M. Witkowski, C. M. Weyand and J. J. Goronzy (2005). "Modulation of CD28 expression with anti-tumor necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **52**(10): 2996-3003.
8. Burgos-Vargas, R., L. J. Catoggio, C. Galarza-Maldonado, K. Ostojich and M. H. Cardiel (2013). "Current therapies in rheumatoid arthritis: a Latin American perspective." Reumatol Clin **9**(2): 106-112.
9. Cardiel, M. H. and J. Rojas-Serrano (2002). "Community based study to estimate prevalence, burden of illness and help seeking behavior in rheumatic diseases in Mexico City. A COPCORD study." Clin Exp Rheumatol **20**(5): 617-624.
10. Carrillo-Bustamante, P., C. Kesmir and R. J. de Boer (2016). "The evolution of natural killer cell receptors." Immunogenetics **68**(1): 3-18.
11. Conigliaro, P., P. Triggianese, C. Perricone, M. S. Chimenti, G. Di Muzio, E. Ballanti, M. D. Guarino, B. Kroegler, G. Gigliucci, S. Grelli and R. Perricone (2014). "Restoration of peripheral blood natural killer and B cell levels in patients affected by rheumatoid and psoriatic arthritis during etanercept treatment." Clin Exp Immunol **177**(1): 234-243.
12. Crome, S. Q., P. A. Lang, K. S. Lang and P. S. Ohashi (2013). "Natural killer cells regulate diverse T cell responses." Trends Immunol **34**(7): 342-349.
13. Cutolo, M., A. Sulli, C. Pizzorni, B. Serio and R. H. Straub (2001). "Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **60**(8): 729-735.
14. de Andres, M. C., E. Perez-Pampin, M. Calaza, F. J. Santaclara, I. Ortea, J. J. Gomez-Reino and A. Gonzalez (2015). "Assessment of global DNA methylation in

- peripheral blood cell subpopulations of early rheumatoid arthritis before and after methotrexate." Arthritis Res Ther **17**: 233.
15. de Rham, C., S. Ferrari-Lacraz, S. Jendly, G. Schneiter, J. M. Dayer and J. Villard (2007). "The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors." Arthritis Res Ther **9**(6): R125.
16. Deane, K. D. (2012). "Learning about the natural history of rheumatoid arthritis development through prospective study of subjects at high risk of rheumatoid arthritis-related autoimmunity." Arthritis Rheum **64**(6): 1708-1712.
17. Deane, K. D., J. M. Norris and V. M. Holers (2010). "Preclinical rheumatoid arthritis: identification, evaluation, and future directions for investigation." Rheum Dis Clin North Am **36**(2): 213-241.
18. Dejaco, C., C. Duftner, A. Klauser and M. Schirmer (2010). "Altered T-cell subtypes in spondyloarthritis, rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica." Rheumatol Int **30**(3): 297-303.
19. Dinesh, P. and M. Rasool (2017). "Multifaceted role of IL-21 in rheumatoid arthritis: Current understanding and future perspectives." J Cell Physiol.
20. Dumitriu, I. E. (2015). "The life (and death) of CD4<sup>+</sup> CD28(null) T cells in inflammatory diseases." Immunology **146**(2): 185-193.
21. Enciso-Vargas, M., B. Ruiz-Madrigal, J. F. Munoz-Valle, O. Y. Morales-Balderas, Z. H. Hernandez-Nazara, E. Martinez-Lopez, C. Davalos-Cobian, J. R. Padilla-Gutierrez, J. R. Torres-Baranda, J. A. Dominguez-Rosales and M. Maldonado-Gonzalez (2017). "Association of -319 C/T and +49 A/G polymorphisms of CTLA-4 gene in patients with hepatitis C virus infection." Med Clin (Barc).
22. Fogel, L. A., W. M. Yokoyama and A. R. French (2013). "Natural killer cells in human autoimmune disorders." Arthritis Res Ther **15**(4): 216.

- 
23. Fransen, J. and P. L. van Riel (2009). "The Disease Activity Score and the EULAR response criteria." Rheum Dis Clin North Am **35**(4): 745-757, vii-viii.
  24. Gharibi, T., J. Majidi, T. Kazemi, R. Dehghanzadeh, M. Motalebnezhad and Z. Babaloo (2016). "Biological effects of IL-21 on different immune cells and its role in autoimmune diseases." Immunobiology **221**(2): 357-367.
  25. Imboden, J. B. (2009). "The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis." Annu Rev Pathol **4**: 417-434.
  26. Islander, U., C. Jochems, M. K. Lagerquist, H. Forsblad-d'Elia and H. Carlsten (2011). "Estrogens in rheumatoid arthritis; the immune system and bone." Mol Cell Endocrinol **335**(1): 14-29.
  27. Ivarsson, M. A., J. Michaelsson and C. Fauriat (2014). "Activating killer cell Ig-like receptors in health and disease." Front Immunol **5**: 184.
  28. Kirino, Y. and E. F. Remmers (2015). "Genetic architectures of seropositive and seronegative rheumatic diseases." Nat Rev Rheumatol **11**(7): 401-414.
  29. Klareskog, L., V. Malmstrom, K. Lundberg, L. Padyukov and L. Alfredsson (2011). "Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis." Semin Immunol **23**(2): 92-98.
  30. Kulkarni, S., M. P. Martin and M. Carrington (2008). "The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease." Semin Immunol **20**(6): 343-352.
  31. Lamana, A., A. M. Ortiz, J. M. Alvaro-Gracia, B. Diaz-Sanchez, J. Novalbos, R. Garcia-Vicuna and I. Gonzalez-Alvaro (2010). "Characterization of serum interleukin-15 in healthy volunteers and patients with early arthritis to assess its potential use as a biomarker." Eur Cytokine Netw **21**(3): 186-194.
  32. Li, Q., L. J. Ye, H. L. Ren, T. Huyan, J. Li, J. L. Shi and Q. S. Huang (2015). "Multiple effects of IL-21 on human NK cells in ex vivo expansion." Immunobiology **220**(7): 876-888.

- 
33. Liu, R., L. Van Kaer, A. La Cava, M. Price, D. I. Campagnolo, M. Collins, D. A. Young, T. L. Vollmer and F. D. Shi (2006). "Autoreactive T cells mediate NK cell degeneration in autoimmune disease." J Immunol **176**(9): 5247-5254.
34. Liu, Y., R. Kuick, S. Hanash and B. Richardson (2009). "DNA methylation inhibition increases T cell KIR expression through effects on both promoter methylation and transcription factors." Clin Immunol **130**(2): 213-224.
35. Majorczyk, E., A. Pawlik, D. Gendosz and P. Kusnierczyk (2014). "Presence of the full-length KIR2DS4 gene reduces the chance of rheumatoid arthritis patients to respond to methotrexate treatment." BMC Musculoskelet Disord **15**: 256.
36. Majorczyk, E., A. Pawlik, W. Luszczek, I. Nowak, A. Wisniewski, M. Jasek and P. Kusnierczyk (2007). "Associations of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with complications of rheumatoid arthritis." Genes Immun **8**(8): 678-683.
37. Malaviya, A. N., A. Sharma, D. Agarwal, S. Kapoor, S. Garg and S. Sawhney (2010). "Low-dose and high-dose methotrexate are two different drugs in practical terms." Int J Rheum Dis **13**(4): 288-293.
38. Maly, K. and M. Schirmer (2015). "The story of CD4+ CD28- T cells revisited: solved or still ongoing?" J Immunol Res **2015**: 348746.
39. Marcos, J., C. Waimann, F. Dal Pra, J. Hogrefe, S. Retamozo, F. Caeiro, L. Casalla, M. Benegas, O. Rillo, A. Spindler, H. Berman, A. Berman, A. Secco, R. Garcia Salinas, A. Catalan Pellet, F. Ceccato, S. Paira, J. C. Marcos, J. A. Maldonado Cocco, G. Citera and Conaart (2011). "General characteristics of an early arthritis cohort in Argentina." Rheumatology (Oxford) **50**(1): 110-116.
40. McGeough, C. M., D. Berrar, G. Wright, C. Mathews, P. Gilmore, R. T. Cunningham and A. J. Bjourson (2012). "Killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen-C genotypes in rheumatoid arthritis primary responders and non-responders to anti-TNF-alpha therapy." Rheumatol Int **32**(6): 1647-1653.

41. McInnes, I. B. and G. Schett (2011). "The pathogenesis of rheumatoid arthritis." N Engl J Med **365**(23): 2205-2219.
42. Miller, S. A., D. D. Dykes and H. F. Polesky (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." Nucleic Acids Res **16**(3): 1215.
43. Moroni, L., I. Bianchi and A. Lleo (2012). "Geoepidemiology, gender and autoimmune disease." Autoimmun Rev **11**(6-7): A386-392.
44. Munoz-Valle, J. F., J. R. Padilla-Gutierrez, J. Hernandez-Bello, Y. Ruiz-Noa, Y. Valle, C. A. Palafox-Sanchez, I. Parra-Rojas, S. R. Gutierrez-Urena and H. Rangel-Villalobos (2017). "PTPN22 -1123G>C polymorphism and anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis." Med Clin (Barc) **149**(3): 95-100.
45. Namekawa, T., M. R. Snyder, J. H. Yen, B. E. Goehring, P. J. Leibson, C. M. Weyand and J. J. Goronzy (2000). "Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4+CD28null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis." J Immunol **165**(2): 1138-1145.
46. Niu, X., D. He, X. Zhang, T. Yue, N. Li, J. Z. Zhang, C. Dong and G. Chen (2010). "IL-21 regulates Th17 cells in rheumatoid arthritis." Hum Immunol **71**(4): 334-341.
47. Pieringer, H. and A. Studnicka-Benke (2013). "What is causing my arthritis, doctor? A glimpse beyond the usual suspects in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." QJM **106**(3): 219-228.
48. Poggi, A. and M. R. Zocchi (2014). "NK cell autoreactivity and autoimmune diseases." Front Immunol **5**: 27.
49. Popko, K. and E. Gorska (2015). "The role of natural killer cells in pathogenesis of autoimmune diseases." Cent Eur J Immunol **40**(4): 470-476.
50. Prakash, S., S. Alam, U. Bharadwaj, A. Aggarwal, R. N. Mishra and S. Agrawal (2014). "Associations of killer cell immunoglobulin like receptors with rheumatoid arthritis among North Indian population." Hum Immunol **75**(8): 802-807.



- 
51. Pratt, A. G., J. D. Isaacs and D. L. Matthey (2009). "Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis." Best Pract Res Clin Rheumatol **23**(1): 37-48.
52. Rabinovich, B. A., J. Li, J. Shannon, R. Hurren, J. Chalupny, D. Cosman and R. G. Miller (2003). "Activated, but not resting, T cells can be recognized and killed by syngeneic NK cells." J Immunol **170**(7): 3572-3576.
53. Rajalingam, R. (2012). "Overview of the killer cell immunoglobulin-like receptor system." Methods Mol Biol **882**: 391-414.
54. Ramirez-De los Santos, S., P. E. Sanchez-Hernandez, J. F. Munoz-Valle, C. A. Palafox-Sanchez, L. Y. Rosales-Rivera, T. Garcia-Iglesias, A. Daneri-Navarro and M. G. Ramirez-Duenas (2012). "Associations of killer cell immunoglobulin-like receptor genes with rheumatoid arthritis." Dis Markers **33**(4): 201-206.
55. Rammos, G. and D. Kondomerkos (2007). "The role of CD4+CD28(null) T-lymphocytes and statins in rheumatoid arthritis and unstable atherosclerotic plaque." Hellenic J Cardiol **48**(3): 165-174.
56. Robustillo Villarino, M. and J. Rodriguez Moreno (2011). "[Are useful prognostic factors in rheumatoid arthritis?]." Reumatol Clin **7**(5): 339-342.
57. Romao, V. C., H. Canhao and J. E. Fonseca (2013). "Old drugs, old problems: where do we stand in prediction of rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and other synthetic DMARDs?" BMC Med **11**: 17.
58. Ruiz-Esquide, V. and R. Sanmarti (2012). "Tobacco and other environmental risk factors in rheumatoid arthritis." Reumatol Clin **8**(6): 342-350.
59. Scott, D. L., F. Wolfe and T. W. Huizinga (2010). "Rheumatoid arthritis." Lancet **376**(9746): 1094-1108.
60. Scott, I. C., C. M. Lewis, A. P. Cope and S. Steer (2013). "Rheumatoid arthritis severity: its underlying prognostic factors and how they can be combined to inform treatment decisions." International Journal of Clinical Rheumatology **8**(2): 247-263.
-

- 
61. Scott, I. C., S. Steer, C. M. Lewis and A. P. Cope (2011). "Precipitating and perpetuating factors of rheumatoid arthritis immunopathology: linking the triad of genetic predisposition, environmental risk factors and autoimmunity to disease pathogenesis." Best Pract Res Clin Rheumatol **25**(4): 447-468.
62. Shi, F. D. and L. Van Kaer (2006). "Reciprocal regulation between natural killer cells and autoreactive T cells." Nat Rev Immunol **6**(10): 751-760.
63. Shi, F. D. and Q. Zhou (2011). "Natural killer cells as indispensable players and therapeutic targets in autoimmunity." Autoimmunity **44**(1): 3-10.
64. Smolen, J. S., D. Aletaha, A. Barton, G. R. Burmester, P. Emery, G. S. Firestein, A. Kavanaugh, I. B. McInnes, D. H. Solomon, V. Strand and K. Yamamoto (2018). "Rheumatoid arthritis." Nat Rev Dis Primers **4**: 18001.
65. Smolen, J. S., D. Aletaha and I. B. McInnes (2016). "Rheumatoid arthritis." Lancet.
66. Smolen, J. S., R. Landewe, F. C. Breedveld, M. Buch, G. Burmester, M. Dougados, P. Emery, C. Gaujoux-Viala, L. Gossec, J. Nam, S. Ramiro, K. Winthrop, M. de Wit, D. Aletaha, N. Betteridge, J. W. Bijlsma, M. Boers, F. Buttgerit, B. Combe, M. Cutolo, N. Damjanov, J. M. Hazes, M. Kouloumas, T. K. Kvien, X. Mariette, K. Pavelka, P. L. van Riel, A. Rubbert-Roth, M. Scholte-Voshaar, D. L. Scott, T. Sokka-Isler, J. B. Wong and D. van der Heijde (2014). "EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update." Ann Rheum Dis **73**(3): 492-509.
67. Tan, I. J., E. Peeva and G. Zandman-Goddard (2015). "Hormonal modulation of the immune system - A spotlight on the role of progestogens." Autoimmun Rev **14**(6): 536-542.
68. Tobon, G. J., P. Youinou and A. Saraux (2010). "The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis." J Autoimmun **35**(1): 10-14.

- 
69. Torres-García, D., R. Barquera and J. Zúñiga (2008). "Receptores de células NK (KIR): Estructura, función y relevancia en la susceptibilidad de enfermedades." Rev Inst Nal Enf Resp Mex **21**(1): 57-65.
70. Umicevic Mirkov, M. and M. J. Coenen (2013). "Pharmacogenetics of disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis: towards personalized medicine." Pharmacogenomics **14**(4): 425-444.
71. van Bergen, J. and F. Koning (2010). "The tortoise and the hare: slowly evolving T-cell responses take hastily evolving KIR." Immunology **131**(3): 301-309.
72. Velarde-de la Cruz, E. E., P. E. Sanchez-Hernandez, J. F. Munoz-Valle, C. A. Palafox-Sanchez, S. Ramirez-de Los Santos, O. Graciano-Machuca, T. Garcia-Iglesias, M. Montoya-Buelna and M. G. Ramirez-Duenas (2016). "KIR2DL2 and KIR2DS2 as genetic markers to the methotrexate response in rheumatoid arthritis patients." Immunopharmacol Immunotoxicol **38**(4): 303-309.
73. Vilches, C., J. Castano, N. Gomez-Lozano and E. Estefania (2007). "Facilitation of KIR genotyping by a PCR-SSP method that amplifies short DNA fragments." Tissue Antigens **70**(5): 415-422.
74. Waldmann, T. A. (2005). "Targeting the interleukin-15 system in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **52**(9): 2585-2588.
75. Williams, A. P., A. R. Bateman and S. I. Khakoo (2005). "Hanging in the balance. KIR and their role in disease." Mol Interv **5**(4): 226-240.
76. Yang, X. K., W. D. Xu, R. X. Leng, Y. Liang, Y. Y. Liu, X. Y. Fang, C. C. Feng, R. Li, H. Cen, H. F. Pan and D. Q. Ye (2015). "Therapeutic potential of IL-15 in rheumatoid arthritis." Hum Immunol **76**(11): 812-818.
77. Yarwood, A., T. W. Huizinga and J. Worthington (2016). "The genetics of rheumatoid arthritis: risk and protection in different stages of the evolution of RA." Rheumatology (Oxford) **55**(2): 199-209.
-

78. Yen, J. H., C. H. Lin, W. C. Tsai, C. C. Wu, T. T. Ou, C. J. Hu and H. W. Liu (2006). "Killer cell immunoglobulin-like receptor gene's repertoire in rheumatoid arthritis." Scand J Rheumatol **35**(2): 124-127.
79. Yen, J. H., B. E. Moore, T. Nakajima, D. Scholl, D. J. Schaid, C. M. Weyand and J. J. Goronzy (2001). "Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis." J Exp Med **193**(10): 1159-1167.
80. Yoshida, Y. and T. Tanaka (2014). "Interleukin 6 and Rheumatoid Arthritis." BioMed Research International **2014**: 12.
81. Yuan, F. L., W. Hu, W. G. Lu, X. Li, J. P. Li, R. S. Xu, C. W. Li, F. H. Chen and C. Jin (2011). "Targeting interleukin-21 in rheumatoid arthritis." Mol Biol Rep **38**(3): 1717-1721.

## 17 ANEXO I

### 17.1 Carta de consentimiento informado

No. de muestra: \_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA



**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO  
PARA PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

Lugar y Fecha \_\_\_\_\_

Código: \_\_\_\_\_

Por medio de la presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado "Estudio de genes *KIR 2DL2/2DL3/ 2DS2* como marcadores genéticos, y de los genes de sus ligandos *HLA*, en respuesta al tratamiento con drogas modificadoras de la enfermedad en artritis reumatoide"

Se me ha explicado que mi participación consistirá en UNA TOMA DE SANGRE PERIFÉRICA POR PUNCIÓN VENOSA.

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes: SE CONTARA CON UN LUGAR ADECUADO PARA LA TOMA DE MUESTRA, EN CUANTO A MOLESTIAS LA POSIBLE FORMACIÓN DE UN HEMATOMA EN LA ZONA DE PUNCIÓN.

El investigador principal se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier procedimiento alternativo adecuado que pudiera ser ventajoso para mi tratamiento (si es que aplica), así como a responder cualquier pregunta y aclarar cualquier duda que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con mi tratamiento.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo o pudiera recibir en el laboratorio de inmunología del CUCS-UDG.

El investigador principal me ha dado la seguridad de que no me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y de que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma confidencial. También se ha comprometido a proporcionarme la información actualizada que se obtenga durante el estudio, aunque esta pudiera cambiar de parecer respecto a mi permanencia en el mismo.

Nombre y Firma del individuo que participará en el estudio

\_\_\_\_\_

Nombre, Matrícula y Firma del investigador principal  
IBT Erandi Enif Velarde de la Cruz

\_\_\_\_\_

Nombre y Firma del Testigo

\_\_\_\_\_

Números telefónicos a los cuales puede comunicarse en caso de emergencia, dudas o preguntas relacionadas con el estudio: 3312418098

**PROYECTO:** Estudio de genes *KIR 2DS2 / 2DL2 / 2DS3* como marcadores genéticos y de los genes de sus ligandos *HLA*, en la respuesta al tratamiento con drogas modificadoras de la enfermedad en artritis reumatoide

## 17.2 Formato del historial clínico de individuos en estudio

Iniciales del Paciente \_\_\_\_\_

No. de muestra: \_\_\_\_\_

### DATOS DEL PACIENTE

1. Nombre completo e iniciales del paciente (usar la primera letra de su primer nombre y los dos apellidos): \_\_\_\_\_ Iniciales:
2. Fecha de Nacimiento:  /  /
3. Edad:  Altura:  Peso:  Género:  Masculino  Femenino
4. Dirección (Calle y colonia): \_\_\_\_\_
5. Ciudad y Estado \_\_\_\_\_ 6. Teléfono: \_\_\_\_\_
4. Estado Civil: Soltero  / Casado  / Unión Libre  / Divorciado  / Viudo
5. Lugar de nacimiento del **PACIENTE**:
6. Lugar de nacimiento de sus **PADRES**: Madre  Padre
7. Lugar de nacimiento de los **ABUELOS**:
  - i. Maternos: Abuela  Abuelo
  - ii. Paternos: Abuela  Abuelo
8. Registro Hospitalario del Paciente: \_\_\_\_\_
9. Fecha de inicio de la dolencia referido por el paciente: \_\_\_\_\_
10. Fecha del diagnóstico / Tiempo de evolución de la enfermedad (años): \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

- |                    |
|--------------------|
| 1 = Jalisco        |
| 2 = Michoacán      |
| 3 = Nayarit        |
| 4 = Zacatecas      |
| 5 = Colima         |
| 6 = Aguascalientes |
| 7 = Guanajuato     |

### ANTECEDENTES

<b>Antecedentes Familiares (especificar que enfermedad padece el familiar y grado del familiar)</b>		
<input type="checkbox"/> Artritis reumatoide	<input type="checkbox"/> D. M. Tipo 1	<input type="checkbox"/> L. E. S.
<input type="checkbox"/> Asma	<input type="checkbox"/> Atopia	<input type="checkbox"/> Sjogrèn
OTRAS: _____		
<b>Factores de riesgo</b>		
Escolaridad	<input type="checkbox"/> Sin estudios	<input type="checkbox"/> Primaria <input type="checkbox"/> Secundaria <input type="checkbox"/> Preparatoria
	<input type="checkbox"/> Licenciatura	
Número de hermanos <input type="text"/>	Número que ocupa entre los hermanos <input type="text"/>	
	Número de habitaciones en casa durante su infancia <input type="text"/>	
Población tipo <input type="checkbox"/> Rural <input type="checkbox"/> Urbana		
Residencia tipo <input type="checkbox"/> Rural <input type="checkbox"/> Urbana		
Tabaquismo Actual <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Tabaquismo previo <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Edad de inicio: <input type="text"/>
Tiempo de tabaquismo (años) _____	Numero de cigarros al día _____	
Convivencia con fumadores: <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Actual: _____	Tiempo: _____
Métodos anticonceptivos <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Tipo: _____	
Antidepresivos: <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Actual: <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	
Menopausia <input type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO	Edad de inicio: _____	
<b>Antecedentes patológicos del paciente (co-morbilidades)</b>		
<input type="checkbox"/> Asma	<input type="checkbox"/> Sjogrèn	<input type="checkbox"/> Hipertensión
<input type="checkbox"/> D. M. Tipo 1	<input type="checkbox"/> D. M. Tipo 2	<input type="checkbox"/> Dislipidemias

**PROYECTO:** Estudio de genes *KIR 2DS2 / 2DL2 / 2DS3* como marcadores genéticos y de los genes de sus ligandos *HLA*, en la respuesta al tratamiento con drogas modificadoras de la enfermedad en artritis reumatoide

Iniciales del Paciente \_\_\_\_\_

No. de muestra: \_\_\_\_\_

SIGNOS Y SINTOMAS			
	SI	NO	TIEMPO (min)
Rigidez matutina			Duración de la rigidez
Fatiga			Duración de la fatiga
NO. DE ARTICULACIONES AFECTADAS			
Deformidad			
Inflamación crónica			

LABORATORIO			
	Valor		biometría hemática
Fecha:			
VSG		Leucocitos	
pCr		Eritrocitos	
RF		Hemoglobina	
Erosión articular en radiografías		VCM	
		HCM	
		Plaquetas	

TRATAMIENTO (desde el inicio hasta el actual)	
Dosis\Fecha	
AINES (especificar)	
Metrotexate	
H-cloroquina	
Sulfazalacina	
Corticoesteroide	
Etarmecept	
Infliximab	
Azatioprina	
Ciclosporina	
Sal de oro	
Omeprazol	
Cirugía AR	
Antidepresivos	
Glucocorticoide (especificar)	
Otros tratamientos: (incluir dosis y tiempo)	

ALGORITMO

PROYECTO: Estudio de genes *KIR 2DS2 / 2DL2 / 2DS3* como marcadores genéticos y de los genes de sus ligandos *HLA*, en la respuesta al tratamiento con drogas modificadoras de la enfermedad en artritis reumatoide



## 17.3 Índice articular del paciente

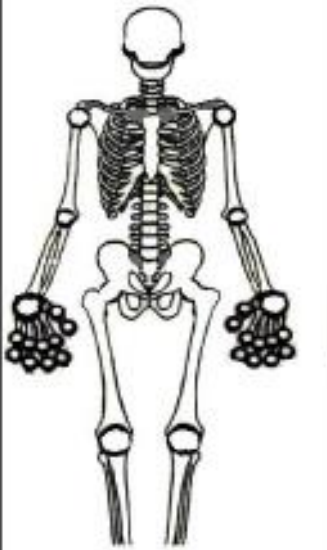
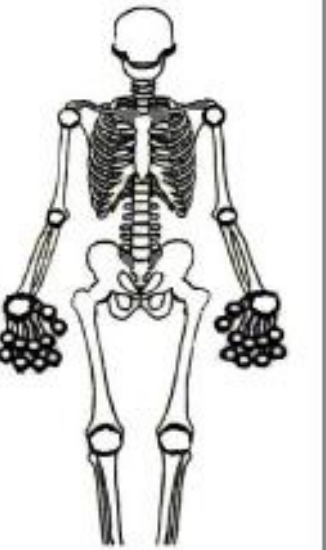
Iniciales del paciente \_\_\_\_\_

Nº de muestra: \_\_\_\_\_

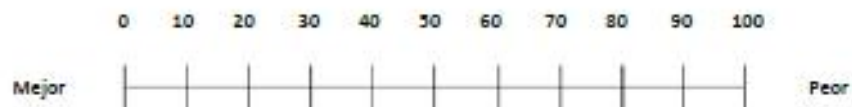
### Índice articular del paciente

Nombre \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Rellene con pluma los círculos que representan las articulaciones afectadas

DOLOR	INFLAMACIÓN
 <p style="text-align: center;">No. Total de articulaciones con dolor: _____</p>	 <p style="text-align: center;">No. Total de articulaciones inflamadas: _____</p>

### Evaluación análoga del paciente



Variable		Puntuación
Índice articular	Doloroso	
	Inflamado	
Evaluación análoga		
VSG o pCr		
Cálculo de DAS28	VSG	
	pCr	

Interpretación de la puntuación de DAS28	
<2.6	Remisión
>2.6- <3.5	Actividad baja
3.5-5.1	Actividad moderada
>5.1	Actividad alta

Proyecto: "Asociación de los genes *KIR2DS2*, *2DL2* y *2DL3* y los genes de sus ligandos *HLA-I* con los niveles de anticuerpos anti-PAD14, anti-MCV, anti-CCP y FR en Artritis Reumatoide"



## 17.4 Escala Análoga visual del paciente

Iniciales del paciente \_\_\_\_\_

Nº de muestra: \_\_\_\_\_

### Índice clínico de actividad de la enfermedad (CDAI)

Articulación	Izquierda		Derecha	
	Dolorosa	Inflamada	Dolorosa	Inflamada
Hombro				
Codo				
Muñeca				
MCP 1				
MCP 2				
MCP 3				
MCP 4				
MCP 5				
PIP 1				
PIP 2				
PIP 3				
PIP 4				
PIP 5				
Rodilla				
TOTAL				



### Análisis global de la actividad de la enfermedad por el paciente

Considerando las diferentes formas en las que le afecta la artritis reumatoide, califique como se siente

MUY BIEN 0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 9.5 10 MAL

### Análisis global de la actividad de la enfermedad por el evaluador

MUY BIEN 0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.5 9.0 9.5 10 MAL

### Puntuación

Variable	Rango	Valor	Interpretación de la puntuación de CDAI	
Puntuación para articulaciones dolorosas	0-28		0.0 – 2.8	Remisión
Puntuación para articulaciones inflamadas	0-28		2.9 – 10.0	Actividad baja
Puntuación global del paciente	0-10		10.1 – 22.0	Actividad moderada
Puntuación global del evaluador	0-10		22.1 – 76.0	Actividad alta
Puntuación global	0-76			

---

## 18 ANEXO II

### 18.1 Genotipificación de *KIR2DL2/S2/L3*

#### 18.1.1 Extracción y cuantificación de gDNA

Se extrajo DNA genómico (gDNA) de acuerdo a la técnica modificada de Miller (Miller, Dykes et al. 1988), descrita a continuación.

En 5 mL de sangre periférica, se añaden 10 mL el volumen de solución de lisis de eritrocitos (10:1 de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.144 M /  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0.01 M) y se incuba en hielo por 15 minutos. Se centrifuga durante 15 minutos a 400 g y se descarta el sobrenadante. Se resuspende el precipitado en 5 mL de lisis de eritrocitos, se centrifuga con las mismas condiciones previas y se descarta el sobrenadante. Se realizan 3 lavados de 1 mL de solución de lisis de eritrocitos. Se resuspende el paquete leucocitario en 3 mL de buffer para lisis de leucocitos (Tris 10 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  2 mM, NaCl 400 mM, pH 8.2), 200  $\mu\text{L}$  de SDS al 10% y 500  $\mu\text{L}$  de proteinasa K (proteínasa K 1 mg/mL (*IBI scientific*®) en SDS al 1% y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  2 mM) y se incuba a 68°C durante 1 hora y media. Posteriormente, se añade solución saturada de NaCl 6 M y se centrifuga a 100 g durante 15 minutos.

Se recupera el sobrenadante y se pasa a otro tubo de centrifuga, se le agrega 2 volúmenes de etanol absoluto y se transfiere el gDNA precipitado en 1 mL de etanol al 70%. Se realizan 3 lavados (adición de 1 mL con etanol al 70%), se descarta el sobrenadante, el precipitado se resuspende en 1 mL de agua inyectable y se almacena a -20°C.

La cuantificación de gDNA se realiza mediante espectrofotometría en el equipo NanoDrop Lite (*Thermo-Fisher*®), con lecturas a 260 nm y 280 nm. La absorbancia a 260 nm establece la concentración de gDNA y 280 nm determina la concentración de proteínas en la muestra. Ambas absorbancias permiten determinar la calidad del DNA mediante una relación entre la longitud de onda de 260 y 280, valores mayores a 1.7 son considerados de buena calidad.

La evaluación de la integridad del DNA se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Se prepararon geles de agarosa (*Vivantis*®) a una concentración de 0.8% con buffer TBE 0.5X (*IBI scientific*®) (Tris base 0.89 M, ácido bórico 0.89 M, EDTA 25 mM, pH 8.0 para TBE 10X) se cargó 7  $\mu\text{L}$  de mezcla, es decir, 5  $\mu\text{L}$  de muestra con 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga, azul de bromofenol (azul de bromofenol 0.25%, azul de xilencianol 0.25%, glicerol 30%). Las

condiciones de la electroforesis fueron las siguientes: 100 Volts, 40 miliAmperes y 5 Watts durante 1 hora y 30 minutos.

La tinción del gel se utilizó 100 mL de solución de tinción (dilución 1:10,000) de SYBR safe (*Invitrogen*®) en buffer TBE 0.5X durante 45 minutos en agitación constante y en oscuridad. Finalmente se visualizaron las bandas en transiluminador *Kodak*® *Bio-imaging Systems Gel Logic* 112 con luz ultra violeta (UV) a 254 nm. Se consideró que una muestra tiene DNA degradado cuando presenta una banda barrida, mientras una banda definida corresponde a una muestra con DNA.

### 18.1.2 Tipificación de *KIR2DL2/S2/L3* por *PCR-SSP*

Para la expresión de CD158b se utilizó un anticuerpo el cual no distingue entre *KIR2DL2*, *KIR2DS2* y *KIR2DL3*; por lo que se tipificaron los genes *KIR2DL2/S2/L3* para inferir cuales son los receptores posiblemente se estén expresando. Para determinar la presencia/ausencia de los 3 genes *KIR* se realizó *PCR-SSP* (del inglés, *Polimerase Chain Reaction - Specific Sequence Primers*) basada en metodología establecida por Vilches, 2007 (Vilches, Castano et al. 2007).

La genotipificación de *KIR2DL2/S2/L3* consiste de 3 reacciones, una para cada gen. El volumen final de reacción es de 20  $\mu$ L con: 1x de *Biomix 2X Bioline*® (*Taq polimerasa*, dNTPs y  $Mg^{+2}$ ), 0.1  $\mu$ M de iniciadores para *HLA-DRA*, 2.5  $\mu$ M de cada oligonucleótido para *KIR*, 20 ng/ $\mu$ L de gDNA y agua estéril (cbp) (Cuadro 21).

**Cuadro 16. Primers para genotipificar *KIR2DL2/S2/L3* por *PCR-SSP***

Reacción	Gen	Primer				pb
		Sentido	$\mu$ M	Contrasentido	$\mu$ M	
2	<i>KIR2DL2</i>	AAACCTTCTCTCTCAGCCCA	2.5	GCCCTGCAGAACCTACA	2.5	142
3	<i>KIR2DL3</i>	AGACCCTCAGGAGGTGA	2.5	CAGGAGACAACTTTGGATCA	2.5	156
7	<i>KIR2DS2</i>	TGCACAGAGAGGGGAAGTA	2.5	CCCTGCAAGGTCTTGCA	2.5	110
Control	<i>HLA-DRA</i>	GAGGTAACGTGTGCTCACGAACAGC	0.1	GGTCCATACCCCAGTGCTTGAGAAG	0.1	283

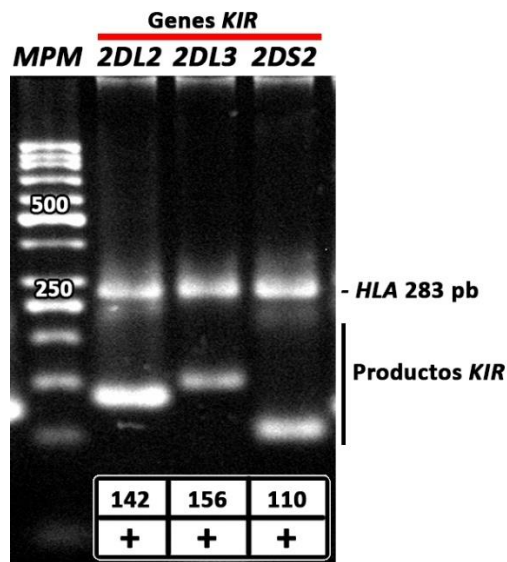
(Vilches, Castano et al. 2007)

Las condiciones de la *PCR-SSP* son de acuerdo a Vilches, 2007 y se describen en el cuadro 22.

**Cuadro 17. Condiciones de PCR-SSP para KIR**

Ciclos	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
1	120	95
10	10	94
	40	65
20	20	94
	20	61
	30	72

Los productos amplificados se resuelven por electroforesis en gel de agarosa al 3% con buffer TBE 0.5X, bajo las siguientes condiciones: 100 Volts, 35 miliAmperes y 5 Watts durante 1 hora y 45 minutos. Los geles se tiñen mediante una tinción de SYBR safe y se observan las bandas en el transiluminador *Kodak® Bio-imaging System Gel Logic 112* con luz UV a 254 nm. (Figura 27).

**Figura 22. Genotipificación de genes *KIR2DL2*, *2DL3* y *2DS2***

Control interno de las reacciones de PCR-SSP: *HLA-DRA* 283 pb. Productos amplificados: *KIR2DL2*: 142pb; *KIR2DS2*: 110pb y *KIR2DL3*: 156 pb

## 19 ANEXO III

### 19.1 Poblaciones celulares y expresión de CD158b en respuesta a tratamiento

**Cuadro 18. Porcentajes de poblaciones celulares en respuesta al tratamiento**

	Grupo de referencia n = 20	Respondedores (n=10)		No respondedores (n=10)	
		Inicio	3 meses	Inicio	3 meses
<b>Células NK (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) (%)</b>	5.55	9.68	15.17 <sup>a, c</sup>	12.62	7.05 <sup>a, b</sup>
NK CD158b <sup>+</sup>	33.13	26.33 <sup>c</sup>	42.31 <sup>a, c</sup>	39.07 <sup>c</sup>	26.30 <sup>a, b, c</sup>
NK CD16 <sup>-</sup>	48.86	62.44	45.46	58.96	51.68
CD16 <sup>-</sup> CD158b <sup>+</sup>	28.42	13.26	19.54	17.09	19.84
NK CD16 <sup>+</sup>	51.14	37.57	54.54	41.04	48.32
CD16 <sup>+</sup> CD158b <sup>+</sup>	29.61	13.26 <sup>c</sup>	19.54	17.09 <sup>c</sup>	19.84
<b>Células T (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>) (%)</b>	42.49	29.44	40.27 <sup>a</sup>	24.23	32.66
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>null</sup>	0.47	2.41 <sup>c</sup>	1.18 <sup>a, c</sup>	1.79	3.69 <sup>a, b, c</sup>
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>null</sup> CD158b <sup>+</sup>	9.57	15.67	10.10 <sup>a</sup>	7.84	21.02 <sup>a, b, c</sup>

<sup>a</sup> Comparación de los porcentajes al inicio y a los 3 meses con una  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> Comparación entre respondedores y no respondedores con una  $p < 0.05$ ; <sup>c</sup> Comparación del grupo de referencia con respondedores y no respondedores con una  $p < 0.05$ . Prueba de *Friedman* con prueba de *Dunn* para comparaciones múltiples.

### 19.2 Expresión de CD158b en respuesta a tratamiento

**Cuadro 19. Expresión de CD158b en respuesta al tratamiento**

	Grupo de referencia n = 20	Respondedores (n=10)		No respondedores (n=10)	
		Inicio	3 meses	Inicio	3 meses
<b>Células NK (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>)</b>	6969 ± 3745	6594 ± 3820	9324 ± 3495	7627 ± 3549	5624 ± 2730 <sup>b</sup>
CD16 <sup>-</sup>	4582 ± 2914	3281 ± 834.5	3622 ± 1102	3312 ± 835.6	4263 ± 2251
CD16 <sup>+</sup> CD158b <sup>+</sup>	7040 ± 4325	6956 ± 2559	10063 ± 3671	8066 ± 1158	6000 ± 1503 <sup>a, b</sup>
<b>Células T (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>)</b>					
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>null</sup>	1719 ± 1322	4951 ± 2247 <sup>c</sup>	2652 ± 1047 <sup>a, c</sup>	4263 ± 2251 <sup>c</sup>	7986 ± 2496 <sup>a, b, c</sup>

Los valores de IFM están presentados en media geométrica y desviación estándar. <sup>a</sup> Comparación de IFM al inicio y a los 3 meses con una  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup> Comparación de IFM entre respondedores y no respondedores a los 3 meses de tratamiento con una  $p < 0.05$ . IFM: Intensidad de fluorescencia media

### 19.3 Niveles séricos de IL-15 e IL-21 en respuesta al tratamiento

**Cuadro 20. Niveles de IL-15 e IL-21 en respuesta a tratamiento**

	Grupo de referencia n = 20	Respondedores n = 10		No respondedores n = 10	
		Inicio	3 meses	Inicio	3 meses
<b>Citocinas</b>					
IL-15	107.9 ± 57.67	125.4 ± 83.05	109.5 ± 48.13	142.2 ± 70.89	121.6 ± 79.62
IL-21	38 ± 25.64 <sup>a</sup>	45.22 ± 33.17 <sup>a</sup>	35.08 ± 24.90 <sup>a</sup>	616.9 ± 457.4	41.60 ± 73.1

Los datos representan con los promedios de cada grupo con desviación estándar. Tx: Tratamiento. Prueba realizada: para datos pareados Prueba de *Friedman* con corrección de *Dunn*, para datos no pareados: Prueba de *Kruskal-Wallis* con corrección de *Dunn*. Citocinas medidas en pg/mL. <sup>a</sup> Comparación con no respondedores con una  $p < 0.05$ .

### 19.3.1 Niveles séricos de IL-15 y expresión de CD158b

**Cuadro 21. Correlación de niveles de IL-15 con la expresión de CD158b**

	Grupo de referencia n = 20	Respondedores		No respondedores		Tx en curso n = 20
		Inicio	3 meses	Inicio	3 meses	
<b>Células NK (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>)</b>	r = 0.23 p = 0.32	r = 0.02 p = 0.43	r = 0.02 p = 0.43	r = -0.05 p = 0.81	r = -0.15 p = 0.61	r = -0.36 p = 0.12
NK CD16 <sup>-</sup>	r = 0.26 p = 0.26	r = -0.02 p = 0.70	r = -0.02 p = 0.70	r = 0.10 p = 0.54	r = 0.10 p = 0.44	r = -0.04 p = 0.88
NK CD16 <sup>+</sup>	r = 0.16 p = 0.49	r = 0.11 p = 0.66	r = 0.11 p = 0.66	r = -0.21 p = 0.96	r = -0.11 p = 0.96	r = 0.45 p = 0.06
<b>Células T (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>)</b>						
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>null</sup>	r = 0.18 p = 0.46	r = -0.24 p = 0.22	r = -0.24 p = 0.22	r = 0.12 p = 0.36	r = 0.22 p = 0.26	r = -0.04 p = 0.86

Los datos representan la correlación (*r*) y la *p* de cada grupo. Grupo de referencia n = 20. Pacientes respondedores n = 20. Pacientes no respondedores n = 20. Pacientes con Tx en curso. Tx: Tratamiento. Prueba: correlación de Spearman

### 19.3.2 IL-21 y expresión de CD158b

**Cuadro 22. Correlación de niveles de IL-21 con la expresión de CD158b**

	Grupo de referencia n = 20	Respondedores		No respondedores		Tx en curso n = 20
		Inicio	3 meses	Inicio	3 meses	
<b>Células NK (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>)</b>	r = -0.13 p = 0.59	r = 0.08 p = 0.73	r = 0.10 p = 0.63	r = -0.17 p = 0.47	r = -0.37 p = 0.17	r = -0.14 p = 0.56
NK CD16 <sup>-</sup>	r = -0.13 p = 0.56	r = 0.27 p = 0.23	r = -0.25 p = 0.30	r = -0.04 p = 0.87	r = 0.14 p = 0.57	r = -0.14 p = 0.56
NK CD16 <sup>+</sup>	r = -0.58 p = 0.81	r = -0.32 p = 0.16	r = 0.30 p = 0.20	r = -0.32 p = 0.15	r = 0.22 p = 0.15	r = -0.06 p = 0.76
<b>Células T (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>)</b>						
CD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>null</sup>	r = -0.01 p = 0.16	r = 0.12 p = 0.72	r = 0.04 p = 0.19	r = -0.70 p = 0.02	r = -0.67 p = 0.02	r = -0.10 p = 0.64

Los datos representan la correlación (*r*) y la *p* de cada grupo. Grupo de referencia n = 20. Pacientes respondedores n = 20. Pacientes no respondedores n = 20. Pacientes con Tx en curso. Tx: Tratamiento. Prueba: correlación de Spearman.



## 20 ANEXOS IV

### 20.1 Artículos publicados

#### 20.1.1 Artículo publicado en: “*Immunopharmacology and Immunotoxicology Journal*”

IMMUNOPHARMACOLOGY AND IMMUNOTOXICOLOGY, 2016  
VOL. 38, NO. 4, 303–309  
<http://dx.doi.org/10.1080/08923973.2016.1194429>



RESEARCH ARTICLE

### *KIR2DL2* and *KIR2DS2* as genetic markers to the methotrexate response in rheumatoid arthritis patients

Erandi Enif Velarde-de la Cruz<sup>a,b\*</sup>, Pedro Ernesto Sánchez-Hernández<sup>a,b\*</sup>, José Francisco Muñoz-Valle<sup>b,c</sup>, Claudia Azucena Palafox-Sánchez<sup>b,c</sup>, Saúl Ramírez-de los Santos<sup>d</sup>, Omar Graciano-Machuca<sup>a,b</sup>, Trinidad García-Iglesias<sup>a</sup>, Margarita Montoya-Buelna<sup>a</sup> and María Guadalupe Ramírez-Dueñas<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Inmunología, Departamento de Fisiología, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México; <sup>b</sup>Doctorado en Ciencias Biomédicas, Departamento de Fisiología, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México; <sup>c</sup>Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México; <sup>d</sup>Departamento de Clínicas, Centro Universitario de los Altos, Universidad de Guadalajara, Tapatitlán, Jalisco, México

#### ABSTRACT

**Context:** Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs (DMARDs) are aimed to interfere with rheumatoid arthritis (RA) progression and reduce the joint damage; however, not all patients respond alike. Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) and their ligands, human leucocyte antigen class I (HLA-I), have been associated with RA pathology; therefore, *KIR* and *HLA* genes may influence the treatment response.

**Materials and methods:** We evaluated the association of *KIR* genotype and their ligands *HLA-C* genes with the response to DMARDs in RA patients. We included 69 patients diagnosed with RA and 82 healthy individuals as the reference group. *KIR* and *HLA-C* genotyping was performed using SSP-PCR. RA patients were assessed at baseline and under treatment at 6 and 12 months; subsequently classified as responders and non-responders in each time period. We evaluated the association between DMARD response and genes using statistical analysis by using Fisher exact test with Bonferroni correction; results were regarded as statistically significant at  $p < 0.05$ .

**Results:** Significant difference was observed in gene frequencies of patients and the reference group, *KIR2DL2* was associated with RA ( $p = 0.031$ , OR = 2.119). We also observed an association between *KIR2DS2* and the response to methotrexate (MTX), moreover, the combination *KIR2DL2+ / KIR2DS2+* was more frequent in responders to MTX ( $p = 0.043$ ).

**Discussion and conclusions:** In our results, responders and non-responders to DMARDs showed *KIR2DS2* and *KIR2DL2* different gene frequencies, therefore, these genes could be used as response predictors to DMARDs treatment. Thus, these genes were also associated with disease severity, as well as the treatment response possibly by the immunoregulatory function of NK cells.

#### ARTICLE HISTORY

Received 9 December 2015  
Revised 18 May 2016  
Accepted 23 May 2016  
Published online 20 June 2016

#### KEYWORDS

Autoimmunity; DMARDs; *KIR* genes; pharmacogenetics; treatment response

## 20.1.2 Artículo publicado en “Human Immunology”



Contents lists available at ScienceDirect



journal homepage: [www.elsevier.com/locate/humimm](http://www.elsevier.com/locate/humimm)



### Distribution of *KIR* genes and *KIR2DS4* gene variants in two Mexican Mestizo populations



Andrea Carolina Machado-Sulbaran<sup>a</sup>, José Francisco Muñoz-Valle<sup>b</sup>, María Guadalupe Ramírez-Dueñas<sup>a</sup>, Christian Johana Baños-Hernández<sup>c</sup>, Omar Graciano-Machuca<sup>a</sup>, Erandi Enif Velarde-De la Cruz<sup>a</sup>, Isela Parra-Rojas<sup>c</sup>, Pedro Ernesto Sánchez-Hernández<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Inmunología, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, Mexico

<sup>b</sup>Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, Mexico

<sup>c</sup>Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, Mexico

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 18 January 2017

Revised 15 July 2017

Accepted 16 July 2017

Available online 19 July 2017

##### Keywords:

KIR

KIR2DS4

Genes

Populations

Mexicans

Mestizos

#### ABSTRACT

Killer immunoglobulin-like receptors (KIR) are transmembrane proteins that regulate NK and T cell subsets by recognizing HLA-I molecules as ligands. The *KIR* gene family consists of 16 genes, located at chromosome 19q13.4. *KIR* gene frequencies vary among populations. In Mexico, *HLA* and genetic ancestry studies show that Mestizo populations have different genetic backgrounds based on admixture with European, African, and Asian ancestry. This study aimed to evaluate the frequencies of *KIR* genes and genotypes in Guerrero and Jalisco, two Mexican Mestizo populations located in the south and the west of the country, respectively, and to compare these frequencies with those of other populations. *KIR* genotyping was performed by SSP-PCR. We observed that *KIR* gene frequencies were similar in both populations. There were 24 genotypes observed in Guerrero, 38 genotypes observed in Jalisco, 15 genotypes shared in both populations and 32 genotypes unique to one population or the other. In 10 individuals, nine novel genotypes were identified. *KIR2DS4* gene variants showed significant differences: The *KIR2DS4*full gene was more common in Guerrero ( $p < 0.0001$ ), and the *KIR2DS4*del variant was more common in Jalisco ( $p < 0.05$ ). Differences in *KIR2DS4* gene variants and genotypic profiles could be influenced by the genetic admixture in both regions.

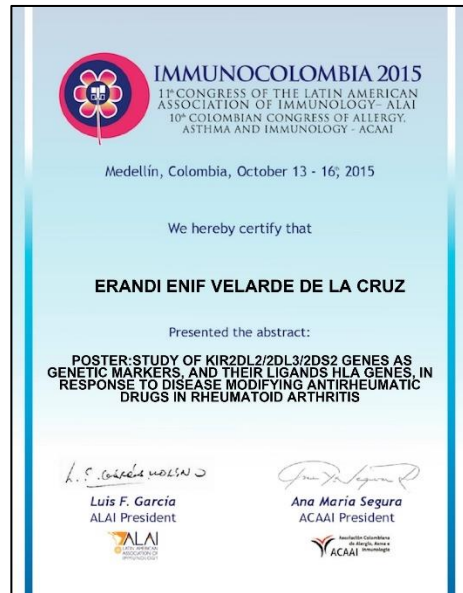
© 2017 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.



## 20.2 Cursos asistidos



## 20.3 Posters presentados





### Estudio de genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* como marcadores genéticos, y de los genes de sus ligandos *HLA*, en la respuesta al tratamiento con drogas modificadoras de la enfermedad en artritis reumatoide

Estudio de genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* como marcadores genéticos, y de los genes de sus ligandos *HLA*, en la respuesta al tratamiento con drogas modificadoras de la enfermedad en artritis reumatoide

Introducción: Las drogas modificadoras de la enfermedad (DMARDs) tienen como objetivo reducir el daño articular en pacientes con artritis reumatoide (AR). Sin embargo, la respuesta al tratamiento es heterogénea, lo que sugiere que existen factores genéticos que influyen en la respuesta al tratamiento. Los genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* son candidatos potenciales para ser marcadores genéticos que influyen en la respuesta al tratamiento con DMARDs.

Objetivos: Evaluar los genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* como marcadores genéticos que influyen en la respuesta al tratamiento con DMARDs en pacientes con AR.

Materiales y Métodos: Se realizó un estudio de asociación de genes (GAW) en 100 pacientes con AR tratados con DMARDs. Se analizaron los genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA*. Se utilizó un enfoque de asociación de genes (GAW) para analizar los datos de asociación de genes.

Resultados: Se identificaron asociaciones significativas entre los genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* y la respuesta al tratamiento con DMARDs. Los genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* fueron asociados con la respuesta al tratamiento con DMARDs en pacientes con AR.

Conclusiones: Los genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* son marcadores genéticos que influyen en la respuesta al tratamiento con DMARDs en pacientes con AR.

### Estudio de genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* como marcadores genéticos, y de los genes de sus ligandos *HLA*, en la respuesta al tratamiento con drogas modificadoras de la enfermedad en artritis reumatoide

Estudio de genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* como marcadores genéticos, y de los genes de sus ligandos *HLA*, en la respuesta al tratamiento con drogas modificadoras de la enfermedad en artritis reumatoide

Introducción: Las drogas modificadoras de la enfermedad (DMARDs) tienen como objetivo reducir el daño articular en pacientes con artritis reumatoide (AR). Sin embargo, la respuesta al tratamiento es heterogénea, lo que sugiere que existen factores genéticos que influyen en la respuesta al tratamiento. Los genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* son candidatos potenciales para ser marcadores genéticos que influyen en la respuesta al tratamiento con DMARDs.

Objetivos: Evaluar los genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* como marcadores genéticos que influyen en la respuesta al tratamiento con DMARDs en pacientes con AR.

Materiales y Métodos: Se realizó un estudio de asociación de genes (GAW) en 100 pacientes con AR tratados con DMARDs. Se analizaron los genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA*. Se utilizó un enfoque de asociación de genes (GAW) para analizar los datos de asociación de genes.

Resultados: Se identificaron asociaciones significativas entre los genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* y la respuesta al tratamiento con DMARDs. Los genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* fueron asociados con la respuesta al tratamiento con DMARDs en pacientes con AR.

Conclusiones: Los genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* son marcadores genéticos que influyen en la respuesta al tratamiento con DMARDs en pacientes con AR.

### *KIR2DL2/2L3/2DS2* expression in NK and T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> cell populations and their association with DMARDs in rheumatoid arthritis patients

*KIR2DL2/2L3/2DS2* expression in NK and T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> cell populations and their association with DMARDs in rheumatoid arthritis patients

Introducción: Las drogas modificadoras de la enfermedad (DMARDs) tienen como objetivo reducir el daño articular en pacientes con artritis reumatoide (AR). Sin embargo, la respuesta al tratamiento es heterogénea, lo que sugiere que existen factores genéticos que influyen en la respuesta al tratamiento. Los genes *KIR2DL2/2L3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* son candidatos potenciales para ser marcadores genéticos que influyen en la respuesta al tratamiento con DMARDs.

Objetivos: Evaluar la expresión de los genes *KIR2DL2/2L3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* en células NK y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en pacientes con AR.

Materiales y Métodos: Se realizó un estudio de asociación de genes (GAW) en 100 pacientes con AR tratados con DMARDs. Se analizaron los genes *KIR2DL2/2L3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA*. Se utilizó un enfoque de asociación de genes (GAW) para analizar los datos de asociación de genes.

Resultados: Se identificaron asociaciones significativas entre los genes *KIR2DL2/2L3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* y la expresión de los genes *KIR2DL2/2L3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* en células NK y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en pacientes con AR.

Conclusiones: Los genes *KIR2DL2/2L3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* son marcadores genéticos que influyen en la expresión de los genes *KIR2DL2/2L3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* en células NK y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en pacientes con AR.

### Study of *KIR2DL2/2DL3/2DS2* genes as genetic markers, and their ligands *HLA* genes, in the response to Disease Modifying Antirheumatic Drugs in Rheumatoid Arthritis

Study of *KIR2DL2/2DL3/2DS2* genes as genetic markers, and their ligands *HLA* genes, in the response to Disease Modifying Antirheumatic Drugs in Rheumatoid Arthritis

Introduction: Disease Modifying Antirheumatic Drugs (DMARDs) are used to reduce the structural damage and to improve joint function in patients with Rheumatoid Arthritis (RA). However, the response to treatment is heterogeneous, suggesting that there are genetic factors that influence the response to treatment. The genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* and the genes of their ligands *HLA* are potential candidates to be genetic markers that influence the response to treatment with DMARDs in patients with RA.

Objective: Evaluate the genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* and the genes of their ligands *HLA* as genetic markers that influence the response to treatment with DMARDs in patients with RA.

Materials and Methods: A Gene Association Study (GAS) was conducted in 100 patients with RA treated with DMARDs. The genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* and the genes of their ligands *HLA* were analyzed. A GAS approach was used to analyze the gene association data.

Results: Significant associations were identified between the genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* and the genes of their ligands *HLA* and the response to treatment with DMARDs. The genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* and the genes of their ligands *HLA* were associated with the response to treatment with DMARDs in patients with RA.

Conclusions: The genes *KIR2DL2/2DL3/2DS2* and the genes of their ligands *HLA* are genetic markers that influence the response to treatment with DMARDs in patients with RA.

### Estudio de genes *KIR2DL2* y *KIR2DS2* como marcadores genéticos en la respuesta al tratamiento con metotrexato en Artritis Reumatoide

Estudio de genes *KIR2DL2* y *KIR2DS2* como marcadores genéticos en la respuesta al tratamiento con metotrexato en Artritis Reumatoide

Introducción: El metotrexato (MTX) es el fármaco de primera línea en el tratamiento de la artritis reumatoide (AR). Sin embargo, la respuesta al tratamiento es heterogénea, lo que sugiere que existen factores genéticos que influyen en la respuesta al tratamiento. Los genes *KIR2DL2* y *KIR2DS2* son candidatos potenciales para ser marcadores genéticos que influyen en la respuesta al tratamiento con MTX.

Objetivos: Evaluar los genes *KIR2DL2* y *KIR2DS2* como marcadores genéticos que influyen en la respuesta al tratamiento con MTX en pacientes con AR.

Materiales y Métodos: Se realizó un estudio de asociación de genes (GAW) en 100 pacientes con AR tratados con MTX. Se analizaron los genes *KIR2DL2* y *KIR2DS2*. Se utilizó un enfoque de asociación de genes (GAW) para analizar los datos de asociación de genes.

Resultados: Se identificaron asociaciones significativas entre los genes *KIR2DL2* y *KIR2DS2* y la respuesta al tratamiento con MTX en pacientes con AR.

Conclusiones: Los genes *KIR2DL2* y *KIR2DS2* son marcadores genéticos que influyen en la respuesta al tratamiento con MTX en pacientes con AR.

### Células NK, T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>, CD158b (*KIR2DL2/2L3/2DS2*) y respuesta a metotrexate (MTX) en AR

Células NK, T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup>, CD158b (*KIR2DL2/2L3/2DS2*) y respuesta a metotrexate (MTX) en AR

Introducción: Las drogas modificadoras de la enfermedad (DMARDs) tienen como objetivo reducir el daño articular en pacientes con artritis reumatoide (AR). Sin embargo, la respuesta al tratamiento es heterogénea, lo que sugiere que existen factores genéticos que influyen en la respuesta al tratamiento. Los genes *KIR2DL2/2L3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* son candidatos potenciales para ser marcadores genéticos que influyen en la respuesta al tratamiento con DMARDs.

Objetivos: Evaluar la expresión de los genes *KIR2DL2/2L3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* en células NK y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en pacientes con AR.

Materiales y Métodos: Se realizó un estudio de asociación de genes (GAW) en 100 pacientes con AR tratados con DMARDs. Se analizaron los genes *KIR2DL2/2L3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA*. Se utilizó un enfoque de asociación de genes (GAW) para analizar los datos de asociación de genes.

Resultados: Se identificaron asociaciones significativas entre los genes *KIR2DL2/2L3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* y la expresión de los genes *KIR2DL2/2L3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* en células NK y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en pacientes con AR.

Conclusiones: Los genes *KIR2DL2/2L3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* son marcadores genéticos que influyen en la expresión de los genes *KIR2DL2/2L3/2DS2* y los genes de sus ligandos *HLA* en células NK y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD28<sup>null</sup> en pacientes con AR.

# 20.4 Memorias de congreso

archivos de CIENCIA  
Revista de Ciencias de la Salud

**XVII CIAM**  
HOSPITAL CIVIL DE GUADALAJARA  
CALIDAD DE VIDA. PRIORIDAD EN SALUD

Guadalajara, Jalisco, México  
Febrero 26, 27 y 28  
2015

EXPO MEDICA

**C088**

**Estudio de genes killer inmunoglobulin-like receptors 2D2 y 2D5a como marcadores genéticos en la respuesta al tratamiento con metotrexato en artritis reumatoide**

Vélez-de la Cruz EE<sup>1</sup>, Sánchez-Hernández PE<sup>2</sup>, Muñoz-Valle JP<sup>3</sup>, Muñoz-Sánchez CA<sup>4</sup>, García-Machaca O<sup>5</sup>, García-Iglesias T<sup>6</sup>, Muñoz-Buena M<sup>7</sup>, Ramírez-Dueñas MG<sup>8</sup>

**Introducción:** La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmunitaria, considerada como un síndrome heterogéneo que difiere en cada individuo en la progresión de la enfermedad y respuesta al tratamiento con DMARD. De forma previa se describió la relación de genes KIR con AR, lo que es posible que participen en dicha heterogeneidad.

**Objetivo:** Determinar las frecuencias de los genes KIR2DL2/2D2 en linfocitos de AR y su respuesta al tratamiento.

**Materiales y métodos:** A 89 pacientes con diagnóstico de AR se les determinó DAS28 (escala) con 12 meses y factor reumatoide (FR). Se incluyeron 16 genes KIR mediante PCR-SSP. Se clasificaron como respondedores y no respondedores a metotrexato (MTX). Se realizó el análisis estadístico por  $\chi^2$ , considerando una diferencia significativa  $p < 0.05$ .

**Resultados:** En los grupos de AR respondedores y no respondedores al tratamiento con MTX, las frecuencias genéticas y genotípicas de KIR presentaron diferencias significativas. Los pacientes vírgenes a tratamiento, KIR2DL2 o KIR2D2, más sus genes asociados, fueron los más asociados a un DAS28 disminuido. Aunque se observó un comportamiento similar en los pacientes KIR2DL2 y KIR2D2, el efecto en sus genes no se asoció con el KIR2DL2+KIR2D2 ( $p < 0.05$ ).

**Conclusiones:** La disminución del DAS28 a los 12 meses se relacionó con los pacientes respondedores a MTX y con la presencia de genes y genotipo KIR2DL2+2D2, lo que sugiere una posible relación o una actividad bajo de la AR.

## Reumatología Clínica

Volúmen 12, Extraordinario 1 | Febrero 2016

### XLIV Congreso Mexicano de Reumatología

Mérida, Yucatán  
10 al 14 de febrero de 2016



**CBc08**

**NK, T CD4+CD28null, CD158b y respuesta al metotrexato (MTX) en la artritis reumatoide**

Vélez-de la Cruz EE<sup>1</sup>, Ramírez-Dueñas MG<sup>2</sup>, Muñoz-Valle JP<sup>3</sup>, Ortiz-Lazareno PC<sup>4</sup>, Martínez-Boquilla GE<sup>5</sup>, García-Osuna KM<sup>6</sup>, Cerpa-Cruz S<sup>7</sup>, Sánchez-Hernández PE<sup>8</sup>

**Introducción:** La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmunitaria caracterizada por daño articular. Los genes KIR se han relacionado con la afectación y la respuesta al tratamiento y codifican a receptores (CD158) expresados en células NK y subpoblaciones de células T.

**Objetivo:** Evaluar la expresión de CD158 en células NK y T CD4+CD28<sup>null</sup> y su relación con la respuesta al tratamiento.

**Materiales y métodos:** Se incluyeron 16 pacientes vírgenes al tratamiento y se trataron con MTX. El porcentaje de NK y T CD4+CD28<sup>null</sup> y la expresión de CD158b se evaluaron por citometría de flujo, al inicio y a los tres meses de tratamiento.

**Resultados:** Los pacientes se clasificaron como respondedores (R; n = 7) y no respondedores (NR; n = 9) al tratamiento. Se compararon ambos grupos y se observó en NR mayor porcentaje de T CD4+CD28<sup>null</sup>CD158b al inicio ( $p = 0.003$ ) y de T CD4+CD28<sup>null</sup> y T CD4+CD28<sup>null</sup>CD158b ( $p = 0.002$  y  $p = 0.0002$ ) a los tres meses; en R, mayor porcentaje de NK y NK CD158b a los tres meses ( $p = 0.033$  y  $p = 0.042$ ). Al comparar el porcentaje de las poblaciones al inicio y a los tres meses se observó en R, incremento de NK y NK CD158b ( $p = 0.015$  y  $p = 0.031$ ), y disminución de T CD4+CD28<sup>null</sup> y CD4+CD28<sup>null</sup>CD158b ( $p = 0.031$  y  $p = 0.016$ ); en NR, disminución de NK y NK CD158b ( $p = 0.033$  y  $p = 0.041$ ), e incremento de T CD4+CD28<sup>null</sup> y CD4+CD28<sup>null</sup>CD158b ( $p = 0.002$  y  $p = 0.0002$ ).

**Conclusiones:** Estos resultados sugieren que el tratamiento podría influir en la expresión de CD158b y porcentaje de NK y T CD4+CD28<sup>null</sup> de pacientes con AR y reflejarse en la respuesta al tratamiento.

**Bibliografía:**  
Thevissen M, Smeets V, Hellings N, Franssen J, Dutoitzeau J, Smitson P. CD4+CD28null T cells in autoimmune disease: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation. J Immunol 2007;179(10): 6514-6523.

**Study of KIR2DL2/2D13/2D5a genes as genetic markers, and their ligands HLA genes, in response to Disease Modifying Antirheumatic Drugs in Rheumatoid Arthritis**

Enrích E, Vélez-de la Cruz EE, Peña Sánchez P, Chacón A, Muñoz-Sánchez J, José T, Muñoz-Valle JP, Muñoz-Sánchez CA, Trujillo G, Iglesias T, Margarita Muñoz-Buena M and María Guadalupe Ramírez-Dueñas<sup>1</sup>

**Background:** Disease Modifying Antirheumatic Drugs (DMARDs) are designed to interfere in progression of rheumatoid arthritis (RA) and reduce the damage to joint in patients. However, patients do not respond equally. KIR genes and their ligands HLA genes have been associated with RA pathologic. Therefore, KIR and HLA genes may influence the response to treatment.

**Methods:** We included 89 patients diagnosed with RA and non clinically healthy subjects. KIR and HLA-C genes genotyping was performed using the PCR-SSP method. 84 patients were classified as responders and non-responders to the treatment with DMARDs. We evaluate the association using statistical analysis by chi-square ( $\chi^2$ ) with Yates correction; results were regarded as statistically significant at  $p < 0.05$ .

**Results:** Significant difference was observed in gene and genotype frequencies of patients and controls. KIR2DL2 and KIR2D4 were associated to RA in KIR-2DL2/2D13/2D5a and patients heterozygous (2D13/2D5a), respectively. Furthermore, AA genotype was associated to a protective factor ( $p < 0.0001$ ). We also observed associations between KIR genes and response to treatment. KIR2DL2 was absent more in non-responders than in responders to anti-rheumatic treatment ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** In most non-responders patients to DMARDs, KIR2DL2 gene is absent. This suggest that KIR2DL2 receptor may be linked to the non-response to treatment, in association with autoantibodies, which would be related to the response to the treatment.

**P015**

**Estudio de genes KIR como marcadores de presencia de anti-CCP y su respuesta a tratamiento con DMARD en pacientes con AR**

Vélez-de la Cruz EE<sup>1</sup>, Sánchez-Hernández PE<sup>2</sup>, Muñoz-Valle JP<sup>3</sup>, Muñoz-Sánchez CA<sup>4</sup>, García-Iglesias T<sup>5</sup>, Muñoz-Buena M<sup>6</sup>, Ramírez-Dueñas MG<sup>7</sup>

**Introducción:** La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune considerada un síndrome heterogéneo, de alta variabilidad en su curso y en la actividad y respuesta al tratamiento. Estudios previos han asociado los genes KIR (killer immunoglobulin-like receptors) con AR, lo que sugiere que pueden influir en la heterogeneidad y respuesta al tratamiento con DMARD.

**Objetivo:** Determinar las frecuencias genéticas de KIR en los subgrupos de anti-CCP positivos y negativos, así como su respuesta al tratamiento.

**Materiales y métodos:** Se incluyeron 64 pacientes con AR estratificados en dos grupos de acuerdo con la presencia de anti-CCP. En ambos grupos, los pacientes se clasificaron con respecto a la actividad de la enfermedad y respuesta a los 6 meses de tratamiento. Se genotiparon los genes KIR mediante PCR-SSP. Se realizó el análisis estadístico por  $\chi^2$  estadístico, considerando una diferencia significativa  $p < 0.05$ .

**Resultados:** KIR2DL2 fue más frecuente en pacientes anti-CCP+, con respecto a los anti-CCP- ( $p < 0.005$ ). En relación con la actividad de la enfermedad, KIR2D2 se asoció con mayor frecuencia en pacientes con actividad baja (relación a los 6 meses del tratamiento) ( $p < 0.05$ ). Considerando la respuesta al tratamiento, en el subgrupo de anti-CCP- el genotipo KIR2DL2+2D5a fue más frecuente en respondedores a DMARD ( $p = 0.01$ ).

**Conclusiones:** En el grupo de anti-CCP+ no se encontró la presencia de KIR2DL2 y el genotipo KIR2DL2+2D5a en los respondedores a tratamiento. Por lo tanto, es posible que receptores KIR participen en la función inmunoregulatoria de las células T influyendo en la producción de autoanticuerpos, lo que afecta la respuesta al tratamiento.

## Reumatología Clínica

Volúmen 13, Extraordinario 1 | Febrero 2017

### XLV Congreso Mexicano de Reumatología

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas  
16 al 21 de febrero de 2017



## Reumatología Clínica

Volúmen 14, Extraordinario 1 | Febrero 2018

### XLVI Congreso Mexicano de Reumatología

Chihuahua, Chihuahua  
16 al 20 de febrero de 2018



## 20.5 Presentación oral



COLEGIO MEXICANO DE REUMATOLOGÍA, A.C.

Ciudad de México a 25 de noviembre de 2016.



**Dr. Daniel X. Xibillé Friedmann**  
Presidente

**Dr. José Luis García Figueroa**  
Vicepresidente

**Dr. Leonardo Limón Camacho**  
Secretario

**Dra. Sandra M. Carrillo Vázquez**  
Tesorera

**Dr. Conrado García García**  
Secretario Suplente

**Dr. Sergio Gutiérrez Ureña**  
Tesorero Suplente

### **Dr. Erandi Enif Velarde de la Cruz**

Laboratorio de Inmunología, Departamento de Fisiología,  
Centro Universitario de Ciencias de la Salud,  
Universidad de Guadalajara.  
[metanarf@gmail.com](mailto:metanarf@gmail.com)

Es un privilegio comunicarle que su trabajo: **Estudio de genes KIR como marcadores de presencia de Anti-CCP y su respuesta a tratamiento con DMARDs en pacientes con AR, con clave P015**, ha sido aceptado para ser presentado en el **XLV Congreso Mexicano de Reumatología en SESIÓN PLENARIA III**, que se llevará a cabo el lunes 20 de febrero de 2017, de 09:00 a 10:30 horas, en los salones *Yaxchilán* y *Palenque* del Centro de Convenciones y Polyforum Chiapas, ubicado en Calz. Andrés Serra Rojas y Libramiento Norte Oriente s/n Tuxtla Gutierrez, Chiapas.

Para ello, contará usted con **10** minutos de presentación, quedando **5** minutos para preguntas y comentarios. Mucho le agradeceremos nos haga llegar las diapositivas de su presentación a más tardar el viernes 03 de febrero de 2017, a la siguiente dirección electrónica: [saul@reumatologia.org.mx](mailto:saul@reumatologia.org.mx), con el fin de coordinar las ponencias de dicha sesión. De no serle posible, requerimos se presente a más tardar a las 8:00 horas del día de su ponencia en el mismo salón con el Ing. Saúl Morales Centeno.

Le solicitamos haga del conocimiento de sus coautores esta notificación. Reciba un saludo atento y felicitaciones por la selección de su trabajo.

Atentamente

Dr. Daniel Xavier Xibillé Friedmann  
Presidente

Dr. Leonardo Limón Camacho  
Secretario

Dr. José Luis García Figueroa  
Vice-Presidente

Dra. Sandra Miriam Carrillo Vázquez  
Tesorera

+52 55 5662.5983 • +52 55 5662.4965 • +52 556382.9894

Paseo del Río 157, Col. Barrio Oxtopolco Universidad, Del. Coyoacán 04318, Ciudad de México. [colegio@reumatologia.org.mx](mailto:colegio@reumatologia.org.mx) [www.reumatologia.org.mx](http://www.reumatologia.org.mx)





Mark Twain once said:

*“With courage you will dare to take risk, have the strength to be compassionate and the wisdom to be humble. Courage is the foundation of integrity”*

Throughout the PhD, I have learned that in life, we also need perseverance to keep going forward and realize that you have the will to make your hopes and dreams come true...

So, remember to believe in you and  
stay **DETERMINED**







***M. en C. Erandi Enif Velarde de la Cruz***

***[metanarf@gmail.com](mailto:metanarf@gmail.com)***