

**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN  
FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Maritza Elizabeth Castillo Gregorio

**Título de la tesis:**

“Evaluación comparativa de células CCR6+/CD45+ y PD-1+/CD45+ entre pacientes urbanos e indígenas con Artritis Reumatoide”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Judith González Christen

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Dra Judith González Christen**

Firma del miembro del jurado

**25/11/2020**

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

JUDITH GONZALEZ CHRISTEN | Fecha:2020-11-26 14:11:27 | Firmante

CFEIXJqU8NHltuFDmg47v/yYa6H+2RtY5vV3+tbJsg2ioSSnFGfmPMXatsq88W4THeXV4k4Kd467PuxMatLR3zqt4OJtf7pkgjJ0LrLzfhRb5C7qNq4Gg91RQ1cAc3jTFgtzC/u1o/COW  
OAu63xgv7InU7ghChT0BovCTbPKWNVSVmJqi/UX7ZRWh57sISNWhHbLvmHofKyYDIQRsOh/w+JRqd2x66+HgBN9SbDvnSKFx6qycg3ulVdH5IKZOfospaqCb3WdAnDGRncS3  
HvKYdEqJWnrIkLz4CVQWDIqe+FIK7+2MhK+U6kD98zLFYaZxrNL94VsjnMtwm9QEYolnLQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



BKUZth

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/DmAj4IMSCfave08Nt8mQib5fJRENpdLF>



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN  
FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Maritza Elizabeth Castillo Gregorio

**Título de la tesis:**

“Evaluación comparativa de células CCR6+/CD45+ y PD-1+/CD45+ entre pacientes urbanos e indígenas con Artritis Reumatoide”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Diana Lizbeth Gómez Galicia

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

**25 nov 2020**

\_\_\_\_\_  
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**DIANA LIZBETH GOMEZ GALICIA** | Fecha:2020-11-25 18:16:20 | Firmante

ykIpb9ZsX6FRgL2LCjQc8EXRmEppFsNMK5u1x4M4wgdIhfrotfPW4A7vKBPFY5ohzU0B9s0xvetK+gDr1mbWeTh6Wa4bGw6Bv5pVqOA/RzkwOEb2ck53QzeDQ1ax3yDLxO/DGCHonoh/Y8MTu1dWpJ69u+CN5yGOz41Luqq27MIV1y6ftG38Xo91gfPyZWfYApuYBb788Tyn0GVy3Dy/3HXf2MzFwYoQeUxap6PHaCBYAWkn6jWYiYCbI+hUk4QhgW9iZi92DYi1hor75YUE+KzZMNdRilk+zqa1tX5OL7RuEFD9204D5YIHFdlInqYwQBixl0w1X5eH4eL5t9Qgug==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**7FGS8p**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/BkxubiPdOx8AxQbi0YOUaaMenLy3VQEN>



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN  
FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Maritza Elizabeth Castillo Gregorio

**Título de la tesis:**

“Evaluación comparativa de células CCR6+/CD45+ y PD-1+/CD45+ entre pacientes urbanos e indígenas con Artritis Reumatoide”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dr. Daniel Xavier Xibillé Friedmann

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Firma del miembro del jurado

**02/Diciembre/2020**

\_\_\_\_\_  
Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**DANIEL XAVIER XIBILLE FRIEDMANN | Fecha:2020-12-02 21:09:29 | Firmante**

AzpbdE9sP2s+2iLJ6llzAxtjSm/d1msZJSe2bg16mvHkl1RSKWpXDbF8lqbdJ+6KzcMUoNsutDQgTe5wzpEBADI3udKJFEPWTwlqIn8BU9HauKkiGWWUQs9U6acQTx1Uc/2s1W0n0C8146exUH9UTyHNKdxogOqfuPIPuW/bvrce/j7k3QncUImiAGB+2UTPxBRvNgMzQFxBiQUkjrRc7SpUZ7xj6ngo8jIWNuAowK1yvxVNlSkBtg3LIrwzGo4jo8I9esJZbeqC+hqqSwVpUW+2bnfxR7OpN3ecdUJcoq8i+P9H48/aNDBhxMrtVKXA/dvQtEfZJ/GS8yRM6/Wg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



I5grZy

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/OUZnjq5U778hK1z2Py3kojC6e4mX2cbX>



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN  
FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Maritza Elizabeth Castillo Gregorio

**Título de la tesis:**

“Evaluación comparativa de células CCR6+/CD45+ y PD-1+/CD45+ entre pacientes urbanos e indígenas con Artritis Reumatoide”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Natividad Sara Concepción García Jiménez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dra Natividad Sara Concepcion Garcia Jimenez      25 noviembre 2020

Firma del miembro del jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**NATIVIDAD SARA CONCEPCION GARCIA JIMENEZ | Fecha:2020-11-25 17:36:11 | Firmante**

C1RBoiV8FH8bwHYB5pg0grWLuJxA/SvFv/rr5EaKwDpgJpoz8xbdt04i+UwJqPkl+/0r3wePS3k5f/k1uS2H9GAxWVrfpYEPA1rK1ldRlp5OUTzmkz3CJ+Fq4BvgqcOTAMvJLdRXz  
hH9Jfp3tEpG/mVzIDrazEYdzqOu4IQ1P0hgJF8ZbS4YDK+v+91ek3No2+HEgRkYkaDufhcWoa3LU69OIVKBSm3rsV4YBICtS7E3sC/AGuURJ8YKgSqahz5w/rHdBfWab9cg8P4oN  
pGYVdPWY8gU1d45rUMJXMxwnpqhoGrpS88xxq+ssezeUGnAit8L3BE+v7Gx4SHyEw9Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



trM9qR

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/5OmL2pFUYxwp7Qc56ohbLQmBJ5IZPOaV>



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN  
FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Maritza Elizabeth Castillo Gregorio

**Título de la tesis:**

“Evaluación comparativa de células CCR6+/CD45+ y PD-1+/CD45+ entre pacientes urbanos e indígenas con Artritis Reumatoide”

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:** Dra. Carolina BustosRivera Bahena

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**CAROLINA BUSTOS RIVERA BAHENA**

Firma del miembro del jurado

**26 DE NOVIEMBRE DEL 2020**

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**CAROLINA BUSTOS RIVERA BAHENA | Fecha:2020-11-26 09:19:58 | Firmante**

rQhkelmryYOPidE0bvPpLDm9C/3d/UnuXk1vYqAYrXtp509eP1C3JgXMSYBVEiUs8F0Ju2llwZd94oUYbYbmZ5ypvuYQeMT3LHUN2L2kOT+wwXANJJkvg++eDtR7SLRJ/mgJwrE0kJfq/PRyrb+aD19yiYx3eIN6U5QzziSaH8X+5SHU31WubHol6RAOUUk5ppvvaBfIkS9K4DvHVpk5H+i4dJiEybvJRSIN03I3vsQE93LSNwotHHfGTIbI8GfxxQmUL8jk0vZ3tyqS9jvq4ekxQWZnRcMAe7Tjb0U0pmx0R8n2VJQ/MY92x8Ui9DAVBFLPFYFvBkRTf92nn+/Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



**MVZhRE**

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/dzYi3XmY66u6YLN6gLYHYtjci0LMbvr>





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO  
DE MORELOS**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Evaluación comparativa de células  
CCR6+/CD45+ y PD-1+/CD45+ entre pacientes  
urbanos e indígenas con Artritis Reumatoide**

**TESIS**

Para obtener el grado de:  
**MAESTRO EN FARMACIA**  
Presenta

**L.F. MARITZA ELIZABETH CASTILLO  
GREGORIO**

TESIS DIRIGIDA POR:  
Dr. JOSÉ LUIS MONTIEL  
HERNÁNDEZ

CUERNAVACA, MOR.

2020



# INDICE

RESUMEN	5
ABREVIATURAS	7
INDICE DE FIGURAS	8
INDICE DE TABLAS	9
1. ARTRITIS REUMATOIDE	
1.1. Generalidades	10
1.2. Factores de riesgo	11
1.3. Fisiopatología	15
1.4. Epidemiología	21
2. ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS EN LA AR	
2.1. Citocinas pro-inflamatorias	22
2.2. PD-1	23
2.3. CCR6	27
2.4. Posible papel de CCR6 y PD-1 como biomarcadores de AR	29
3. ARTRITIS REUMATOIDE EN POBLACIONES INDÍGENAS	
3.1. Estudios previos	30
3.2. Posibles factores de riesgo	34
4. JUSTIFICACION	36
5. PREGUNTA DE INVESTIGACION	37
6. HIPOTESIS	
6.1. Hipótesis alternativa	38
6.2. Hipótesis nula	38
7. OBJETIVOS	
7.1. Objetivo general	39
7.2. Objetivos específicos	39
8. MATERIAL Y METODOS	
8.1. Diseño experimental	39
8.2. Poblaciones de estudio y permisos.	40
8.3. Criterios de selección de pacientes.	40
8.4. Variables evaluadas	41
8.5. Toma y procesamiento de muestras sanguíneas.	42
8.6. Estandarización de condiciones control para titulación	

de marcadores CD45, PD-1 y CCR6.	44
8.6.1. Condiciones basales en donadores sanos.	44
8.6.2. Estimulación de CMSP con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA).	45
8.7. Titulación individual de anticuerpos para los marcadores PD-1, CCR6 y CD45.	47
8.7.1. Titulación anticuerpo para PD-1.	47
8.7.2. Titulación anticuerpo para CCR6.	48
8.7.3. Titulación anticuerpo para CD45.	49
8.8. Estandarización del panel multicolor: PD-1-/ CCR6/ CD45.	50
8.9. Determinación de los porcentajes celulares y abundancia relativa de receptores PD1 y CCR6.	51
8.10. Evaluaciones séricas de pacientes.	52
8.11. Análisis estadístico.	52
<b>9. RESULTADOS</b>	
9.1. Características clínicas de grupos de pacientes.	53
9.2. Comparación de la frecuencia relativa de subpoblaciones celulares entre donadores y pacientes. 57	
9.3. Comparación de la frecuencia relativa de poblaciones celulares PD-1+/CD45+, PD-1+/CD45-, PD-1-/CD45+, CCR6+/CD45+, CCR6+/CD45- y CCR6-/CD45+ entre pacientes de Morelos e indígenas.	58
9.4. Comparación total de la abundancia relativa las subpoblaciones celulares y el nivel de presencia relativo por célula de los marcadores celulares entre pacientes de Morelos e indígenas.	60
9.5. Relación entre la frecuencia relativa de subpoblaciones de células PD-1+/CD45+, PD-1+/CD45-, PD-1-/CD45+, CCR6+/CD45+, CCR6+/CD45- y CCR6-/CD45+y actividad clínica de pacientes indígenas con AR.	62
<b>10. DISCUSION</b>	
10.1. Comparación inmunológica entre pacientes de Morelos e indígenas con AR.	63
10.2. Comparación y diferencias fenotípicas en células sanguíneas entre pacientes urbanos e indígenas.	65

10.3. Limitaciones del estudio.	67
11. CONCLUSIONES	69
12. BIBLIOGRAFIA	70
13. ANEXOS	

## INDICE DE ABREVIATURAS

AR	Artritis Reumatoide.
aCCP	Anticuerpos Anti Péptido Cíclico Citrulinado.
ACR	Colegio Americano de Reumatología
ADN	Ácido Desoxirribunucleico
APC	Células Presentadoras de Antígeno
APD	Enzima Arginin-Peptidil Deiminasa
AINES	Antiinflamatorios No Esteroides
CETS	Centro Estatal de Transfusión Sanguínea
CD4	"Cluster of differentiation 4", marcador de linfocitos cooperadores
CD8	"Cluster of differentiation 4", marcador de linfocitos citotóxicos
CD45	"Cluster of differentiation 4", marcador de activación
CCR6	Receptor de
CMNSP	Células Mononucleares de Sangre Periférica
COX	Ciclooxigenasa
DAS	Disease Activity Score
EBNA2	Factor de transcripción EB antígeno nuclear 2
EC	Epítipo Compartido
ECL	Lectina de Erythrina cristagalli
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EULAR	Liga Europea contra el Reumatismo.
FARMEs	Fármacos Modificadores de la Enfermedad
FLS	Sinoviocitos tipo fibroblasto
FR	Factor Reumatoide
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
HLA-DRB1	Locus dentro del gen que codificada para el HLA-II
HLA II	Complejo Principal de Histocompatibilidad tipo II en humanos
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IL	Interleucina
IL-6	Interleucina 6
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
Man	Manosa
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MMP	Metaloproteasas de matriz
NK	Células Natural Killer o Asesinas Naturales
PAD	Peptidilarginina deiminasa
PBS	Buffer de Fosfatos Salino
PD-1	Receptor de muerte programada 1
PFH	Paraformaldehído
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PVP	Polivinilpirrolidona
RANKL	Activador del receptor del ligando del NFκB
RE	Retículo Endoplásmico
SFB	Suero Fetal Bovino
TCR	Receptor de Linfocitos T
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
VSG	Velocidad de Sedimentación Globular

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Desarrollo y progresión de la Artritis reumatoide	Pág. 14
Figura 2	Niveles de complejidad durante la fisiopatología de la AR.	Pág. 17
Figura 3	Mecanismos que intervienen en el inicio y progresión de Artritis Reumatoide.	Pág. 19
Figura 4	Interacción entre PD-1 y PDL-1 ocurre por contacto entre la célula T y célula presentadora de antígeno	Pág. 24
Figura 5	Estructura general de PD-1 y sus ligandos	Pág. 25
Figura 6	Separación de células de sangre periférica de pacientes urbanos e indígenas.	Pág. 43
Figura 7	Nivel basal de PD-1 en células mononucleares de donadores.	Pág. 45
Figura 8	Nivel basal de CCR6 en células mononucleares de donadores.	Pág. 45
Figura 9	Niveles basales de PD-1 de células mononucleares de sangre periférica de donadores sanos posterior a 24 hrs de estimulación con PMA.	Pág. 46
Figura 10	Niveles basales de CCR6 de células mononucleares de sangre periférica de donadores sanos posterior a 24 hrs de estimulación con PMA.	Pág. 46
Figura 11	Titulación de anticuerpo anti-PD-1.	Pág. 48
Figura 12	Titulación de anticuerpo anti-CCR6.	Pág. 49
Figura 13	Titulación de anticuerpo anti-CD45.	Pág. 50
Figura 14	Estandarización del panel multicolor:	Pág. 51
Figura 15	Comparación entre pacientes urbanos e indígenas con AR en base en base a título de FR.	Pág. 55
Figura 16	Comparación entre pacientes urbanos e indígenas en base al número de articulaciones dolorosas.	Pág. 56
Figura 17	Comparación de la actividad clínica de todos los pacientes urbanos e indígenas.	Pág. 57
Figura 18	Comparación de la distribución de subpoblaciones celulares en las preparaciones de donadores control y pacientes urbanos e indígenas con AR.	Pág. 58
Figura 19	Comparación representativa de las subpoblaciones PD-1+/CD45+, PD-1+/CD45- y PD-1-/CD45+ en ambos grupos de pacientes.	Pág. 59
Figura 20	Comparación representativa de las subpoblaciones P CCR6+/CD45+, CCR6+/CD45- y CCR6-/CD45+ en ambos grupos de pacientes.	Pág. 60
Figura 21	Análisis de correlación entre el índice de actividad clínica (DAS28) y el porcentaje relativo de las poblaciones PD-1+/CD45+, PD-1+/CD45- en el grupo de pacientes indígenas.	Pág. 63

## INDICE DE TABLAS

Tabla I	Genes que han mostrado asociación con susceptibilidad y protección en AR	Pág. 9
Tabla II	Principales Citocinas implicadas durante la AR	Pág. 22
Tabla III	Estudios clínicos de asociación entre células PD-1 y AR	Pág. 26
Tabla IV	Estudios de relación entre CCR6 y AR	Pág. 28
Tabla V	Estudios en poblaciones indígenas con AR	Pág. 30
Tabla VI	Características generales de pacientes y donadores.	Pág. 53
Tabla VII	Comparación del promedio de la abundancia relativa de las subpoblaciones celulares a evaluar, así como de la abundancia relativa por célula (IMF) para cada marcador celular.	Pág. 61

## RESUMEN

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune, crónica e inflamatoria, que sin un tratamiento modificador de enfermedad, evoluciona hacia la discapacidad, impactando de manera notable en la calidad de vida de los pacientes. En nuestro país, en base a estudios en varias regiones, se considera una prevalencia promedio de 1.6%. La evolución clínica del paciente es muy heterogénea por lo cual resulta de gran importancia la evaluación de marcadores moleculares que ayuden al clínico a decidir sobre el procedimiento farmacológico más acorde con el paciente. Entre los cientos de moléculas evaluadas a ese respecto, PD-1 y CCR6 son moléculas presentes en células inmunes tanto en sangre periférica como en líquido sinovial, que parecen jugar un papel fisiológico durante esta patología, sin embargo, su utilidad como biomarcadores no ha sido evaluada previamente. Por otro lado, estudios recientes han identificado que las enfermedades musculoesqueléticas y la Artritis Reumatoide (AR) tienen un impacto mayor en poblaciones vulnerables, como son los individuos de comunidades indígenas. En base a los pocos estudios realizados previamente, suponen una gran heterogeneidad entre las poblaciones, sin embargo, algo en que coinciden es que el escenario es peor en los indígenas (mayor actividad clínica de la enfermedad y menor respuesta al tratamiento). Debido a la escasa cantidad de estudios, se ignora si las diferencias con respecto a poblaciones no-indígenas son causadas por su exclusión de servicios o si es una característica propia de la población. Con esta idea, realizamos una colaboración con la Clínica Esquipulas de San Cristóbal de las Casas para iniciar la caracterización clínica de los pacientes con AR de las comunidades indígenas de la región de los Altos de Chiapas. El objetivo propuesto fue comparar los niveles de los marcadores PD-1 y CCR6 en células mononucleares de sangre periférica positivas para el marcador de activación CD45, tanto de pacientes indígenas como de urbanos con AR. Posterior a la estandarización del procedimiento para verificar que las muestras obtenidas en Chiapas y en Cuernavaca fueran equivalentes para la evaluación por citometría de flujo, se realizaron evaluaciones en paralelo. En total, el estudio consiguió evaluar 20 muestras de pacientes indígenas y 25 muestras de pacientes derivados del Hospital General de Cuernavaca (urbanos) con AR. Al comparar sus características demográficas y clínicas, se pudo observar diferencias significativas en el tiempo desde el inicio de síntomas, título de FR, porcentaje de  $\alpha$ CCP positivo, pero no de actividad clínica. Por su parte, tras el análisis de fenotipificación para los marcadores PD-1, CCR6 y CD45 en la subpoblación de linfocitos de sangre periférica se observó que los pacientes indígenas mostraron niveles

significativamente mayores de las poblaciones PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> y abundancia relativa por célula de PD-1. Por su parte, no se observaron diferencias significativas para las poblaciones de linfocitos CCR6<sup>+</sup> o los marcadores celulares CCR6 o CD45. Finalmente, se evaluaron por análisis de correlación, la posible relación entre los niveles de poblaciones celulares o nivel de marcador celular y la actividad clínica y aunque se observó ligera tendencia a mostrar una relación positiva entre los niveles de PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> y el DAS28, esto no alcanzó significancia estadística. En base a estos resultados, se propone que a diferencia el marcador CCR6 en linfocitos sanguíneos que no fue diferente entre ambos grupos de pacientes, el nivel de PD-1 y las poblaciones de linfocitos positivas fue mayor en los pacientes indígenas, en comparación con los pacientes urbanos. Sin embargo, el cambio en el nivel parece no asociarse con cambio en la actividad clínica, por lo que se requiere más estudio para identificar los posibles factores de su expresión, así como su posible papel en la patología.

# 1. ARTRITIS REUMATOIDE

## 1.1. Generalidades

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad crónico-degenerativa, autoinmune, inflamatoria e incapacitante, con una prevalencia a nivel mundial de entre 0.5 y 1% y que puede progresar hacia la discapacidad, de no recibir un tratamiento a tiempo y adecuado para modificar la enfermedad [1-3]. La AR es la enfermedad más frecuente entre las enfermedades autoinmunes y su incidencia es varias veces más frecuente en mujeres que en hombres (en una relación de 3:1), particularmente entre los 40–60 años. Presumiblemente, una de las causas por la cual es más frecuente en mujeres que en hombres podría deberse al efecto que tienen algunas hormonas sexuales (como los estrógenos) sobre el sistema inmunológico [2].

La AR puede afectar a cualquier articulación diartroïdal y otros tejidos, pero principalmente afecta a las articulaciones metacarpofalángicas, proximales interfalángicas y metatarsfalángicas, muñecas y rodillas. No obstante, también puede causar otro tipo de manifestaciones clínicas (extra-articulares), tales como vasculitis, glomerulonefritis, pericarditis, pleuritis, escleritis, entre otras; siendo los nódulos reumatoides las manifestaciones extraarticulares más frecuentes, presentándose en un 7% en pacientes con AR en etapa temprana y un 30% de pacientes lo desarrollan en una etapa tardía de la enfermedad [4, 5].

Asimismo, la AR establecida se caracteriza principalmente por una poliartritis simétrica, es decir, que afecta las articulaciones de ambas manos, muñecas y pies. Al tiempo que también genera sinovitis y la formación de autoanticuerpos. La degradación de la matriz extracelular es un sello distintivo de la AR en procesos avanzados, ya que es responsable de la destrucción de cartílago, ligamentos, tendones y huesos y, por lo tanto, de las deformaciones e incapacidad [1, 6]. La severidad de la AR puede fluctuar con el tiempo, y resulta en el desarrollo progresivo de los diversos grados de destrucción de las articulaciones, deformidad, la disminución significativa en el estado funcional y el incremento en la morbilidad y mortalidad del paciente. Las principales manifestaciones de la AR en los pacientes son dolor, tumefacción y disminución de la movilidad. El dolor puede presentarse desde una forma leve con el movimiento hasta un dolor intenso y persistente durante el reposo; se puede exacerbar con la presión y el movimiento. La tumefacción articular se desarrolla debido al tejido sinovial proliferante, el cual se encuentra engrosado, con edema y, a menudo, con tensión debido al incremento de líquido sinovial [4, 7].

## 1.2. Factores de riesgo

Los factores específicos que llevan al desarrollo de la AR aún se desconocen, sin embargo, múltiples estudios han señalado que intervienen factores genéticos, ambientales e inmunológicos y que la interacción entre estos puede ser determinante en el desencadenamiento y progresión de la enfermedad [8]. En general se asume que el desarrollo de la AR está determinado por un genotipo predisponente sobre el cual los factores ambientales y biológicos operan para dar como resultado la respuesta sinovial inflamatoria y destructiva.

Con respecto a los factores de riesgo genéticos, varios estudios han identificado que muchos loci genético están asociados con el desarrollo de la AR (Tabla I), llegando a contabilizarse más de 100 genes [9]. Sin embargo, algunos de ellos parecen tener una frecuencia significativa más alta entre las diferentes poblaciones humanas, tales como los loci para HLA DRB1/4 y PTEN. Merece una mención particular el HLA DRB1/4 porque parece ofrecer una explicación molecular al desarrollo de la autoinmunidad por modificaciones pos-traduccionales en las proteínas humanas, a este loci se conoce como "epítoto compartido"[10]. La presencia de variaciones polimórficas en un tramo de 5 aminoácidos de la secuencia de las cadenas polipéptidicas para el HLA clase II, como HLA-DRB1\*01 y HLA-DRB1\*04, parece desempeñar un papel clave para selección de los péptidos antigénicos a reconocer por el sistema inmune adaptativo. Ahora se sabe que los aminoácidos incluidos en el tramo conocido como "epítoto compartido" se distribuyen en el fondo y pared del surco de reconocimiento antigénico de la cadena beta del HLA. Se sugiere que la presencia de algunas variantes de aminoácidos favorece el reconocimiento de péptidos cotidianamente descartados. Ahora se sugiere que sí la presencia de "epítoto compartido" coincide con citrulinación de proteínas (por ejemplo, como consecuencia del tabaquismo) y procesos infecciosos o de "peligro" celular, se pueden dar las condiciones para iniciar un proceso autoinmune [11, 12].

Aunque otros genes muestran asociaciones para el desarrollo de AR más débiles que el HLA DRB1 (Tabla I) también pueden contribuir en su desarrollo, especialmente al considerar las interacciones gen-gen y gen-ambiente [13, 14].

Los factores de riesgo de tipo ambiental para el desarrollo de la AR son varios, dentro de los cuales destacan el tabaquismo, la periodontitis y el efecto del microbioma oral,

intestinal o pulmonar, así como las infecciones virales. Sin duda uno de los elementos más reconocidos que favorece el desarrollo de AR, sobretodo en personas con epítotope compartido positivo, es el tabaquismo. A ese respecto, dentro de los mecanismos propuestos para explicar su efecto, se asume que la toxicidad pulmonar del humo del tabaco desencadena un proceso de daño tisular que favorece la expresión y activación de la enzima Arginin-Peptidil Deiminasa (APD) de tipo IV en neutrófilos, lo que lleva a la citrulinación de proteínas solubles a nivel alveolar [15]. Como se describirá después, este evento favorece la generación de una respuesta inmune de memoria en contra de neoantígenos citrulinados (ver Figura 2 y 3).

TABLA I. Genes que han mostrado asociación con susceptibilidad y protección en AR[16].

<b>Gen</b>	<b>Localización</b>	<b>SNP</b>	<b>OR</b>	<b>Valor de p</b>
<i>HLA-DRB1</i>	6p21.3	rs6910071	2.88	$1.0 \times 10^{-299}$
<i>PTPN22</i>	1p13.3-13.1	R620W	1.91	$9.1 \times 10^{-74}$
<i>PADI4</i>	1p36	rs2240340	1.14	$7.5 \times 10^{-5}$
		rs10818488	1.28	$1.40 \times 10^{-8}$
<i>TRAF1-C5</i>	9q33-34	rs3761847	1.13	0.001
		rs3087243	0.44	$1 \times 10^{-8}$
<i>CTLA4</i>	2q33	rs231775	1.16	0.002
<i>STAT4</i>	2q32.2	rs7574865	1.32	$2.81 \times 10^{-7}$
		rs13426947	1.15	$7.2 \times 10^{-10}$
<i>IRF5</i>	7q32	rs2004640	1.14	0.003
		rs10488631 rs2004640	1.19 1.14	$1.2 \times 10^{-6}$
<i>FCRL3</i>	1q21-23	rs7528684	1.10	0.002
<i>TNFAIP3</i>	6q32	rs6920220	1.22	$1 \times 10^{-9}$
		rs10499194	1.25	$6.7 \times 10^{-4}$
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	6p21	-308G/A	1.62	$3.6 \times 10^{-5}$
<i>miR-499</i>	20q11.22	rs3746444	1.62	0.001
<i>CD28</i>	2q33	rs1980422	1.11	$1.3 \times 10^{-9}$
<i>CD40</i>	20q12-q13.2	rs4810485	0.87	$8.2 \times 10^{-9}$
<i>FCGR3A</i>	1q23	158V/F	1.25	0.01
<i>TYK2</i>	19p13.2	rs34536443	0.62	$2.3 \times 10^{-14}$
<i>IRAK1</i>	Xq28	rs13397	1.27	$1.2 \times 10^{-12}$

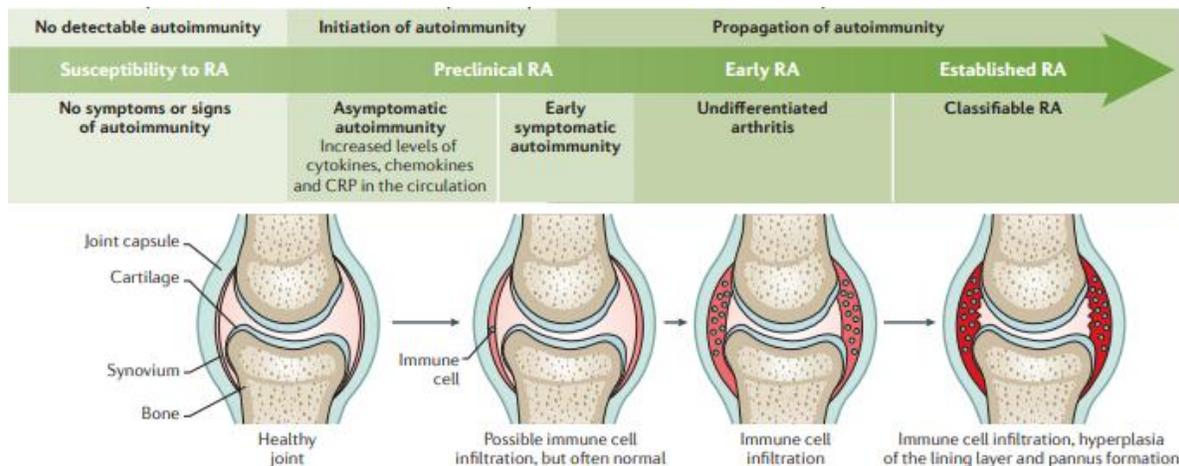
Con respecto al efecto de la periodontitis y alteraciones del microbioma varios estudios, incluidos algunos de nuestro grupo de investigación, sugieren que algunas especies bacterianas del género *Prevotella* y *Aggregatibacter*, que se están presentes en el tracto gastrointestinal y las especies orales *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* parecen asociarse con el desarrollo de la AR. En el caso particular de *P. gingivalis*, se reconoce que su presencia se incrementa en los procesos de periodontitis. En estas condiciones, varios estudios han reportado que coincide con la expresión y secreción de la enzima PAD bacteriana, capaz de citrulinar (desaminación de amino secundaria de las argininas) proteínas del hospedero. Se asume que la generación de proteínas y péptidos citrulinados, como efecto de tabaquismo o disbiosis (alteraciones en el microbioma), en un contexto inflamatorio o de daño tisular (tabaquismo y periodontitis), resultará en su presentación por células dendríticas para seleccionar clonas de linfocitos T y B, que se activarán de manera específica ante la presencia de eventos de citrulinación, como se ha observado que ocurre en las etapas muy tempranas de la AR [17]. Además, *A. actinomycetemcomitans*, que produce una toxina que aumenta la entrada de calcio en los neutrófilos, puede conducir a la citrulinación de los péptidos y recientemente se ha implicado en la etiología de la AR [18]. Nuevos datos también sugieren que las bacterias pueden translocarse desde el intestino a los tejidos, causando inflamación y, eventualmente, autoinmunidad.

La relación entre los factores genéticos y los factores ambientales son evidente en base a observaciones recientes de que las moléculas HLA-DR de pacientes con AR presentan péptidos de autoantígenos que tienen homología de secuencia con epítomos de proteínas de especies bacterianas comensales presentes en RA [14].

Por otro lado, también se ha sugerido que similitudes entre secuencias de aminoácidos de proteínas propias del hospedero y bacterias o proteínas virales podría generar una respuesta autoinmune; este mecanismo se conoce como mimetismo molecular. De esta manera, la infección por el virus de Epstein-Barr y particularmente del factor de transcripción EB antígeno nuclear 2 (EBNA2) se ha visto asociada con la AR y otras enfermedades autoinmunes [19].

Los factores de estilo de vida modificables también se han implicado en la AR. Por ejemplo, la obesidad se ha asociado de manera consistente e independiente con un aumento moderado en el riesgo de AR posterior [20-22]. Las mujeres con alta sintomatología del trastorno de estrés postraumático también tienen un mayor riesgo de desarrollar AR. Se ha encontrado que el bajo nivel socioeconómico, incluido el bajo nivel educativo, se asocia con

peores resultados de la AR, aunque los estudios que respaldan esta posibilidad requieren una mayor expansión [23, 24].



**Figura 1. Desarrollo y progresión de la Artritis reumatoide.** Tomado de Smolen, JS. et al. 2018 [23].

Se cree que la progresión de la AR opera mediante la acción de mecanismos discretos a lo largo de un continuo patológico, lo cual permite suponer la presencia de ventanas de oportunidad terapéutica para intervenciones específicas de cada etapa que podrían derogar o incluso prevenir la AR.

Tanto los factores de riesgo genéticos como los no genéticos contribuyen a la AR, y es probable que se requieran múltiples factores de riesgo antes de alcanzar un umbral por encima del cual se desencadena la AR. Varios expertos están de acuerdo en que el desarrollo de la enfermedad ocurre en varias etapas, como se ilustra en la Figura 1. De tal manera, que la primera etapa corresponde con la presencia de factores de susceptibilidad genética, sin generar aún síntomas o alteraciones de la fisiología normal de la articulación. Una segunda etapa supone la generación de una respuesta autoinmune, caracterizada por la presencia de linfocitos T o B autorreactivos en contra de auto-antígenos, así como la presencia de autoanticuerpos como los anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinado ( $\alpha$ CCP) o factor reumatoide (FR). Sin embargo, se continúa en una fase preclínica porque no hay síntomas significativos en el paciente, aunque en algunas ocasiones se puede sugerir alteraciones inmunológicas e inflamatorias. En una etapa siguiente, que puede ocurrir varios años después, se inicia la generación de síntomas inflamatorios a nivel articular, pudiendo autolimitarse y manejarse por tratamientos tópicos, por lo cual es poco visible por los reumatólogos. En el caso de que el proceso inflamatorio continúe, se entraría en la etapa

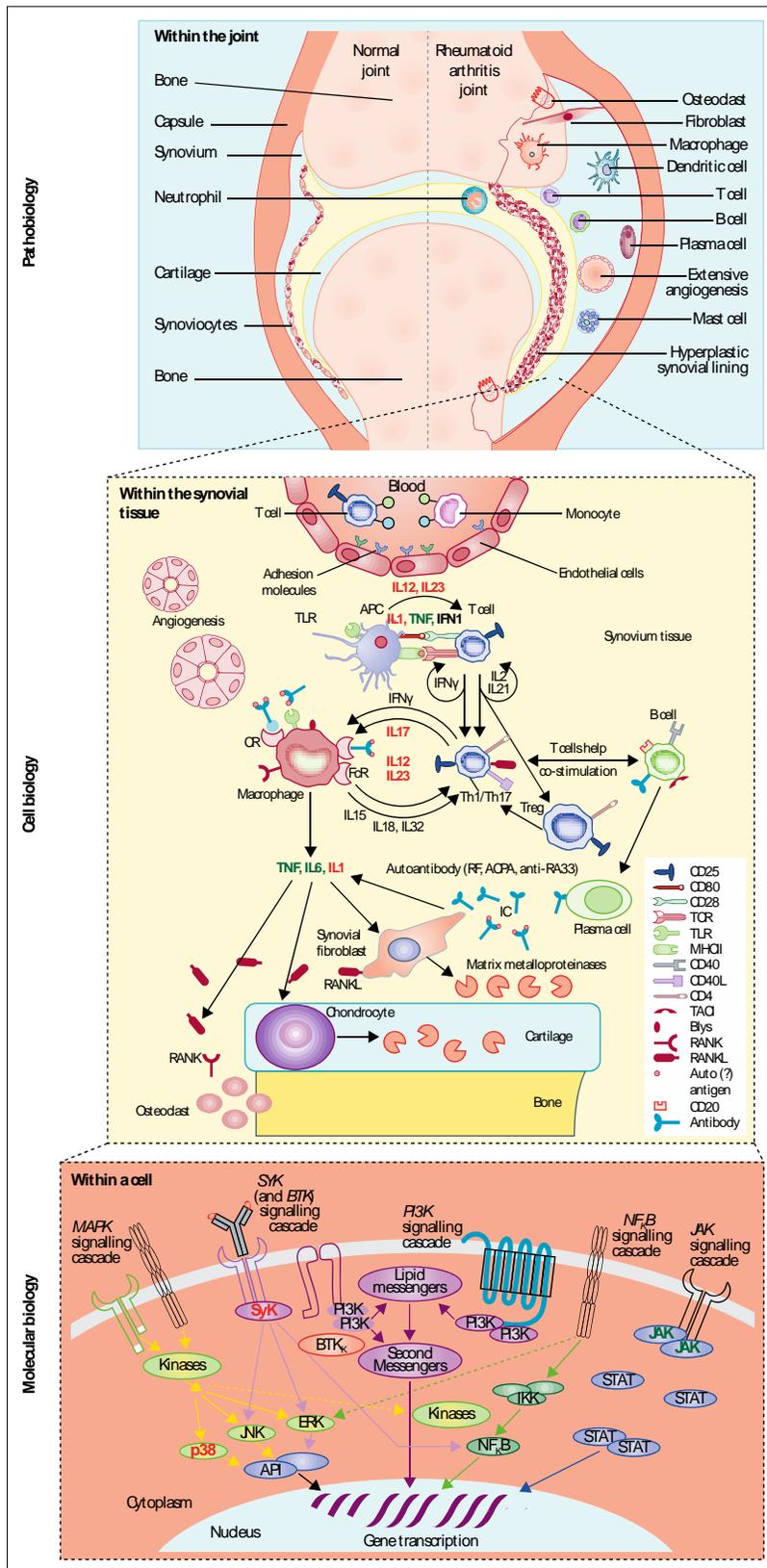
reconocida como Artritis indiferenciada o Artritis temprana, donde ocurren diferentes eventos inflamatorios en la articulación (ver sección siguiente). Finalmente, de no haber un tratamiento farmacológico adecuado, la sinovitis (inflamación de la membrana sinovial) y los síntomas clínicos derivarán en daño estructural o radiológico, que implica la erosión de cartílago y hueso, así como daño de tendones, ocasionando a la deformidad y discapacidad (Artritis establecida)[23].

La presencia de autoanticuerpos ( $\alpha$ CCP o FR) en el paciente se asocia con un curso de enfermedad más agresivo y, por lo tanto, puede usarse no solo como marcador de diagnóstico sino también como marcador de pronóstico. La presencia de niveles altos de  $\alpha$ CCP por sí sola no es suficiente para causar sinovitis, por lo cual se sugiere que se requiere la suma de otros factores adicionales, por ejemplo, la formación de inmunocomplejos, la activación del sistema de complemento o daños microvascular, para iniciar una sinovitis clínica caracterizada por una mayor permeabilidad vascular e influjo de células inflamatorias en la membrana sinovial [13]. Además de los  $\alpha$ CCP, otros autoanticuerpos están presentes en altos niveles, tales como los que reconocen inmunoglobulinas (es decir, FR), colágeno tipo 2 (particularmente en forma oxidada), glucosa-6-fosfato isomerasa, proteoglicanos, antígenos nucleares y otros autoantígenos articulares.

### **1.3. Fisiopatología**

Como se mencionó antes, la patogénesis de la AR comienza años antes de que la enfermedad clínica sea evidente, aunque también es posible la aparición aguda que refleja la perturbación inmune inmediata. Por lo tanto, la AR se considera un proceso continuo que comienza con una etapa de susceptibilidad, basada principalmente en los factores de riesgo genéticos, y continúa a través de la AR preclínica antes de que se desarrolle la inflamación articular (AR temprana). Por su parte, los factores de riesgo ambientales intervendrán a lo largo de la progresión de la enfermedad, por lo cual resulta tan importante su conocimiento, porque se ha propuesto que la ausencia de los factores ambientales, a pesar de tener susceptibilidad genética, no se favorecería el desarrollo de la AR [25, 26]. Como se describe en la Figura 2, la fisiopatología de la AR es un proceso muy complejo porque implica diferentes niveles de complejidad, iniciando por las alteraciones tisulares a nivel sinovial, continuando con los cambios celulares y moleculares de la membrana sinovial y terminando con las modificaciones extra e intracelulares en las células sinoviales e inmunes.

La AR temprana se caracteriza por una inflamación sinovial basada en la infiltración de células mononucleares, dominada por las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, así como células B y monocitos, junto con la activación temprana de las células sinoviales tipo fibroblasto (Figura 2, alteraciones patológicas). Estudios realizados con biopsias sinoviales tomadas dentro de 1 semana del inicio de los síntomas muestran una alta expresión de enzimas que degradan la matriz (como las metaloproteinasas de la matriz (MMP)) en el revestimiento de la intima sinovial. La mayoría de los estudios clínicos sugieren que los mecanismos patogénicos en la membrana sinovial se establecen en fase temprana y permanecen notablemente estables durante los años siguientes, mostrando un mayor grado de daño tisular y, por ende, limitando su posible restauración [2, 23].



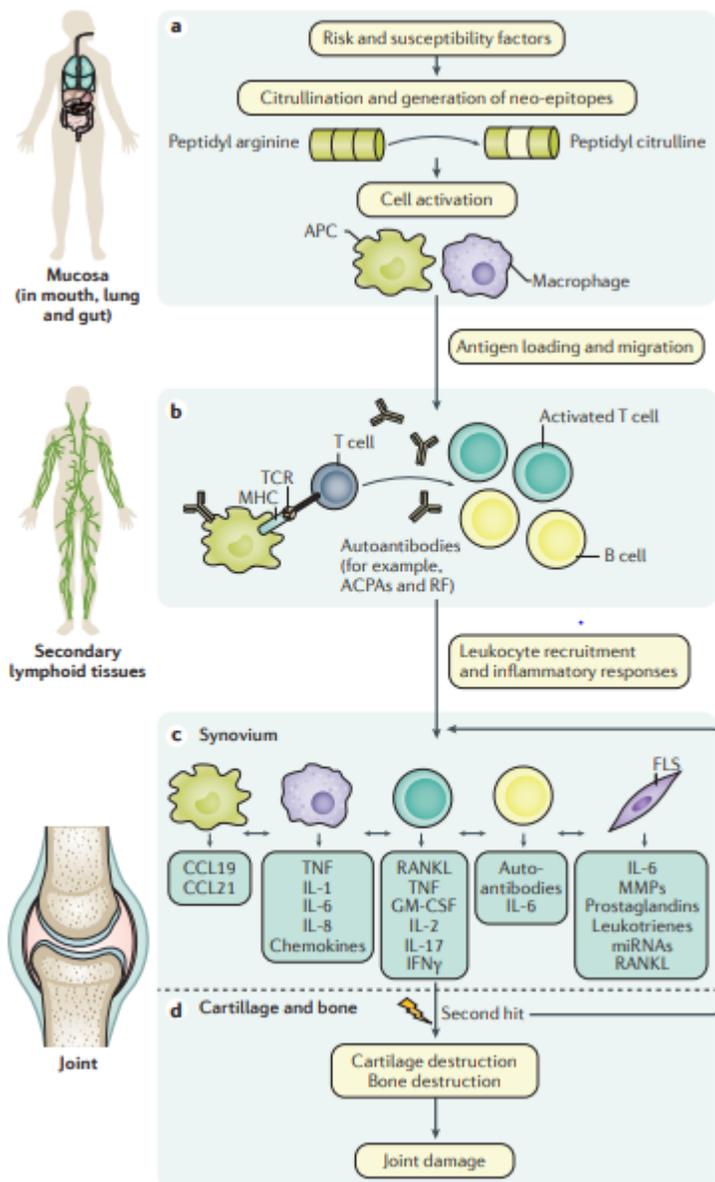
**Figura 2. Niveles de complejidad durante la fisiopatología de la AR.** Tomado de Smolen, J.S., Aletaha, D and McInnes, I.B. 2016. Rheumatoid arthritis. The Lancet.[2]

Conjuntamente con el inicio de activación celular, varias moléculas pro-inflamatorias se incrementarán a nivel sinovial y sistémico, favoreciendo la proliferación y activación celular (Figura 2, alteraciones a nivel celular). Entre ellas, se incrementa la expresión y la secreción de moléculas como el activador del receptor del ligando del NFκB (RANKL), las prostaglandinas y las metaloproteinasas de la matriz son inducidas por el microambiente de citocinas pro-inflamatorias, dentro de los cuales destacan el factor de necrosis tumoral (TNF) y la IL-6, debido a que medían los signos y síntomas de la enfermedad, incluyendo dolor e hinchazón y degradación de cartílago y hueso. Otra manera de evidenciar su importancia ha sido por el efecto tan exitoso que han mostrado tratamientos que bloquean específicamente este tipo de citocinas. Estos eventos moleculares y celulares dan como resultado la expresión clínica de la enfermedad. La progresión del daño articular está intrínsecamente asociada con la inflamación articular [13]. Mención particular merece el incremento en la expresión y secreción de quimiocinas y factores de crecimiento que inducirán la infiltración de células hacia el espacio sinovial y la segunda, favorecerán el crecimiento y diferenciación celular por ejemplo de nuevos vasos sanguíneos y centros germinales (Figura 3).

Finalmente, el papel de los macrófagos y los sinoviocitos tipo fibroblasto (FLS) en perpetuar la sinovitis es más importante en la enfermedad establecida. Otro de los eventos característicos de la AR temprana es la hiperproliferación de los FLS, ocasionando la generación de un tejido conocido como "*pannus*", lo cual desemboca en la inflamación articular crónica. Además de los papeles de citocinas pro-inflamatorias, se reconoce que eventos epigenéticos (patrones de metilación del ADN) se modificarán en el curso de la AR y, por lo tanto, pueden controlar la evolución de la enfermedad mediante su papel en eventos de diferenciación, adhesión y proliferación celular [2].

Uno de los eventos característicos de la AR es la inflamación de la membrana sinovial como consecuencia de la activación autoinmune, y se caracteriza por la infiltración de leucocitos en el compartimento sinovial normalmente escasamente poblado (Figura 2). La composición celular de la sinovitis en la artritis reumatoide incluye células inmunes innatas (por ejemplo, monocitos, células dendríticas, células cebadas y células linfoides innatas) y células inmunes adaptativas (por ejemplo, células Th1 y Th17, células B y células plasmáticas)[27-29]. Como se describió antes, los fibroblastos sinoviales tendrán un papel central en el fenotipo inflamatorio, dado que participan directamente tanto en la proliferación celular y regulación de matriz extracelular, así como en el catabolismo de condrocitos y activación de osteoclastos, promoviendo así la destrucción articular. Por otro lado, estudios con biopsias de articulaciones pequeñas y análisis moleculares detallados (particularmente

transcriptómicos) sugieren que pueden existir diferentes perfiles celulares sinoviales entre los diferentes pacientes con AR, sugiriendo que la evolución y respuesta al tratamiento de los diferentes pacientes pudiera explicarse, en parte, por el perfil celular infiltrante, donde algunas veces sería dominante las células mieloides, linfocíticas o fibroblásticas. Eventualmente esto podría ser de importancia terapéutica o pronóstica en el manejo de los pacientes artríticos [30].



**Figura 3. Mecanismos que intervienen en el inicio y progresión de Artritis Reumatoide.** Tomado de Smolen, 2018[23].

El microambiente inflamatorio en el compartimento sinovial está regulado por una red compleja de citocinas y quimiocinas, derivadas tanto de las células inmunes infiltradas,

como de las células sinoviales. Se reconoce que las citocinas y las quimiocinas son por excelencia los moduladores de la inducción o agravamiento de la respuesta inflamatoria al activar las células endoteliales y atraer las células inmunes para que se acumulen dentro del compartimento sinovial. Los fibroblastos activados, junto con las células T y B activadas, así como los monocitos y macrófagos, desencadenan la activación de osteoclastos a través del activador del receptor del ligando del factor nuclear  $\kappa$  B (RANKL). Todo esto, lleva a la generación de destrucción del cartílago y erosiones óseas del área "desnuda", localizada en la región de la unión entre el cartílago, la inserción de la membrana sinovial perióstica y el hueso [31].

Por su parte, la matriz del cartílago se degrada por acción de diferentes metaloproteinasas de la matriz, así como otras enzimas, varias de las cuales son secretadas y activadas proteolíticamente por los FLS, así como por la acción de citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF (Figura 2).

Finalmente, el último nivel de alteración durante la patogénesis de la AR corresponde a los cambios que ocurren en los receptores de membrana y cascadas de señalización intracelular (Figura 2, alteraciones intracelulares). Un aspecto crucial para la infiltración de células hacia el espacio sinovial es el incremento de selectinas e integrinas en la superficie celular de las células endoteliales. Por otro lado, múltiples receptores de factores de crecimiento y citocinas pro-inflamatorias se expresarán en la superficie de las células inmune y sinoviales, incrementando la activación celular por diferentes mecanismos de comunicación intracelular, ya sea por activación de cascadas dependientes de fosfatilinositidos y generación de segundos mensajeros, fosforilación de moléculas adaptadoras como Syk, Jak/Stat, MAP cinasas (Erk, Mek, p38), PI3K, etc. En su conjunto, la integración de las diferentes cascadas de señalización modificará tanto el metabolismo, citoesqueleto y programa de expresión génico de las células sinoviales.

En su conjunto, estas evidencias sugieren que la AR probablemente se desarrolla por múltiples factores en el tiempo, por lo que una combinación inicial de factores ambientales, de estilo de vida y estocásticos que ocurren en un individuo genéticamente predispuesto y modificado epigenéticamente podría ocasionar el rompimiento de la tolerancia inmunológica y, por tanto, la generación de un proceso autoinmune. Sin embargo, se asume que sin la presencia de factores "disparadores" o "desencadenantes", el individuo podría llevar una vida prácticamente asintomática. La presencia crónica de estos factores desencadenantes, posiblemente producto de procesos infecciosos (facilitado particularmente por vías asociadas con HLA clase II), induciría la expansión de la autoinmunidad mediada por células T y,

posteriormente, la quimiotáxis de células inmunes activadas hacia el espacio sinovial. En base a estudios clínicos, se sugiere que la transición entre la sinovitis aguda y crónica sería crucial para evolucionar hacia AR. Es importante destacar que esta transición debe ocurrir en una etapa temprana porque un diagnóstico y tratamiento precoz puede revertir los síntomas inflamatorios y tisulares de la AR, pudiendo llevar hasta la remisión de los síntomas en el paciente. Por lo tanto, el diagnóstico y tratamiento temprano de AR preclínica se ha convertido en un foco de actividad de investigación, con el objetivo de utilizar la terapia preventiva; El término “ventana de oportunidad” se refiere cada vez más a aspectos preventivos en lugar de intervenciones en la enfermedad temprana pero clínicamente ya manifiesta [2].

Muchas de estas células y moléculas enriquecidas en el espacio sinovial artrítico en han sido evaluadas como posibles blancos terapéuticos con notable éxito en la artritis reumatoide y, posteriormente, en otras enfermedades inflamatorias. Por lo tanto, mientras que los eventos patogénicos que inician y median la cronicidad de la sinovitis aún no se comprenden completamente, han surgido múltiples ideas de estudios genéticos, epidemiológicos, de la biología traslacional y terapéuticos.

#### **1.4. Epidemiología**

La prevalencia de la AR es aproximadamente entre el 0.5 y el 1% a nivel mundial, de la población adulta, siendo más frecuente en mujeres que en hombres (3:1) [32, 33]. En nuestro país, el estudio de prevalencia más completo fue realizado entre los años 2009 a 2011, siguiendo la metodología tipo COPCORD, este es un programa orientado a la comunidad para el control de enfermedades reumáticas, es una iniciativa de la Liga Internacional de Asociaciones de Reumatología lanzada a finales de la década de 1980 en colaboración con la Organización Mundial de la Salud para recopilar datos sobre dolor y discapacidad en las comunidades [127]. En este estudio fueron evaluadas poblaciones de 5 regiones diferentes (Nuevo León, Chihuahua, Sinaloa, CDMX y Yucatán). La metodología COPCORD identifica a los pacientes que cumplen con los criterios para ser considerados AR por evaluación clínica directa (en sus casas), en lugar de esperar que los pacientes acudan al servicio hospitalario. Este estudio mostró una prevalencia de 0.7 y 1.0% para Nuevo León y CMX, respectivamente; de 1.8-1.9% para Chihuahua y Sinaloa, respectivamente y de 2.8% para Yucatán. Con base a esto se estimó que la prevalencia promedio nacional fue de 1.6% [34,

35]. Este estudio además muestra que hay una importante heterogeneidad entre diferentes regiones de nuestro país, lo cual podría sugerir que los factores (genéticos o no-genéticos) que propician su desarrollo pueden ser muy diferentes a los de otras poblaciones. Así también, los resultados preliminares de un estudio piloto en una comunidad Tzotzil del municipio de Chenalhó, Chiapas, mostró una prevalencia de AR mayor que el promedio nacional [36]. Es importante resaltar que, aunque se considera que la AR no es una enfermedad mortal, su presencia está fuertemente vinculadas a la mortalidad prematura en pacientes con AR [37]. Varios estudios reportan que la mortalidad se incrementa en los pacientes, con respecto a individuos sanos, además de que las complicaciones cardiovasculares y renales aumentan considerablemente [38].

## 2. ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS EN LA AR

### 2.1. Citocinas pro-inflamatorias

Múltiples estudios han confirmado que el proceso inflamatorio característico de los pacientes con AR y los eventos que llevan al daño estructural (erosión de cartílago y hueso) son regulados por el microambiente circulante y sinovial de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento [31, 39-41]. Factores que son liberados por muy diferentes tipos celulares, pero que en su conjunto participan en la funcionabilidad de los componentes celulares tanto de la inmunidad innata como adaptativa. Para explicar las diferentes interacciones celulares, las citocinas son elementos de gran importancia, no sólo para explicar la respuesta inflamatoria, sino para entender los eventos que llevan a la cronicidad durante la patogénesis de la AR, como se puede observar en la Tabla II. Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular para las que se tienen receptores en varios tipos de células del sistema inmune e incluso en células que no son del sistema inmune. Como se observa en la Tabla I, el reconocimiento de la citocina por su receptor va a ocasionar la activación de ciertas funciones en la célula blanco, tales como proliferación, diferenciación y secreción de otras moléculas inflamatorias (prostaglandinas, iNOs, MMPs, fosfolipasas, etc.). En su conjunto estas moléculas permitirán establecer el microambiente inflamatorio propicio no sólo para atraer nuevas células sanguíneas.

Tabla II. Principales Citocinas implicadas durante la AR. Tomado de McInnes L and Schett, I. (2007)

Citocinas	Células productoras	Función en Artritis Reumatoide
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Monocitos, células B, fibroblastos y condrocitos	Secreción de citocinas, MMP's, liberación de PGE <sub>2</sub> , activación de osteoclastos. Disminución de GAG, expresión de iNOS, expresión de moléculas de adhesión.
<b>TNF</b>	Monocitos, células T células B, NK, PLM, fibroblastos y osteoblastos	Activación de monocitos, liberación de citocinas y PGE <sub>2</sub> , estallido respiratorio, disfunción TCR y regulación clonal, expresión de moléculas de adhesión, disminución en la síntesis de colágeno, aumento de MMP's, liberación de ácidos grasos libres.
<b>IL-17</b>	Células Th17, fibroblastos	Liberación de citocinas y MMP's, activación de osteoclastos, disminución de GAG.
<b>IL-7</b>	Monocitos y fibroblastos*	Expansión clonal de linfocitos T, activación de macrófagos, maduración de NK, disregulación tímica.
<b>IL-10</b>	Monocitos, células T células B, células dendríticas y células epiteliales	Liberación de citocinas, disminución de la expresión de MHC-II, inducción de anergia en Treg, aumento del cambio de isotipo de células B
<b>IL-6</b>	Monocitos, fibroblastos, células B y T	Proliferación de linfocitos B y T, producción de anticuerpos.

<b>TGF-β</b>	Fibroblastos, monocitos, células T, plaquetas	Fibrosis, proliferación de Th17, activación de macrófagos.
<b>MIF</b>	Macrófagos, células T activadas, fibroblastos	Aumento de la fagocitosis, liberación de citocinas e iNO, activación celular, proliferación fibroblástica, expresión de PLA <sub>2</sub> , alteración del mecanismo oxidoreducción celular.

Extraído de: McInnes L and Schett, I. (2007) [42].

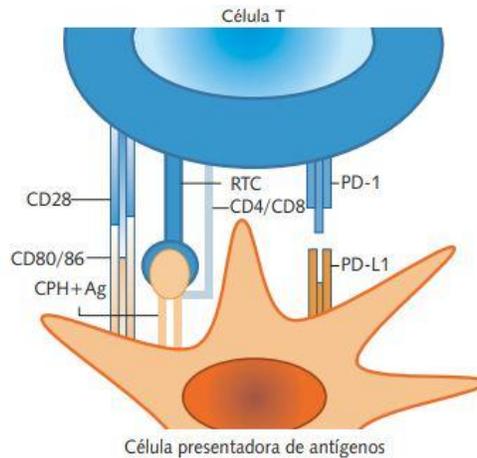
Asimismo, resultados de nuestro laboratorio han sugerido que otros tejidos parecen influir sobre la inflamación crónica. En este caso, el tejido adiposo secreta diferentes moléculas de señalización que influyen sobre la respuesta inmunológica, tales como Leptina, adiponectina y resistina. De esa manera, los niveles circulantes de leptina parecen influir en la respuesta clínica de los pacientes con AR y, potencialmente, permitirían predecir la respuesta al tratamiento modificador de la enfermedad (FARMEs) en pacientes sin obesidad [21, 22, 43]. Asimismo, estudios recientes con linfocitos T CD4<sup>+</sup> circulantes de pacientes con AR nos sugieren que los niveles altos de leptina favorecen un incremento en su sensibilidad a proliferar, resistir a la apoptosis y secretar las citocinas pro-inflamatorias IL-6, IL-17 y TNF [44]. Todo eso sirve como evidencia de que la caracterización del perfil de citocinas circulante puede ser muy informativo sobre las características fisiopatológicas de la AR y, eventualmente, podrían servir como marcadores de pronóstico o respuesta terapéutica en los pacientes.

Conjuntamente con el análisis de las citocinas pro-inflamatorias, se han realizado estudios clínicos de largo plazo para caracterizar los subtipos celulares de pacientes en diferentes etapas de su enfermedad y su asociación con el tratamiento con metrotexato [45]. De manera semejante, varios estudios han propuesto que los niveles de las moléculas de superficie de células sinoviales y plasmáticas pudieran servir como marcadores de la enfermedad [27, 40, 46-50]. En esta lógica, proponemos en este estudio evaluar los niveles de las proteínas PD-1 y CCR6 como biomarcadores de la AR.

## 2.2. PD-1

El gen *pdcd1* que codifica para la proteína PD-1 ("Programmed cell Death protein 1") se localiza en el cromosoma 2 (2q37.3) y es responsable de la síntesis de un receptor de membrana de un solo paso intermembranal con una extensión total de 268 aa. PD-1 es miembro de la superfamilia de B7/CD28, los cuales se relacionan con la inmunomodulación celular. Varios estudios han mostrado que la activación de PD-1 ejerce un efecto inhibitorio de la activación de linfocitos T al interactuar con sus ligandos: PDL1 y PDL2. La molécula

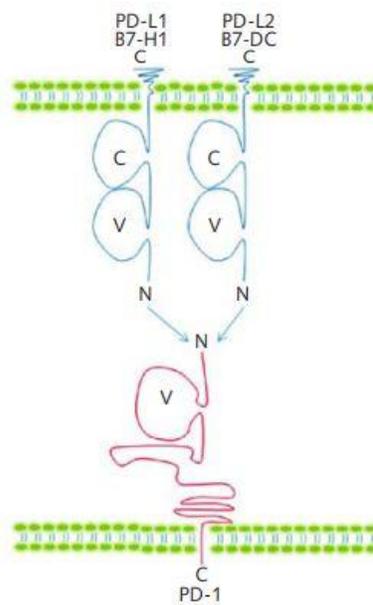
PD-1 tiene función coestimuladora que proporciona una señal inhibitoria, regulando negativamente la activación de las células T.



**Figura 4. Interacción entre PD-1 y PDL-1 ocurre por contacto entre la célula T y célula presentadora de antígeno.** Tomado de Vargas-Rojas, 2008 [51].

Como se observa en la Figura 4 y 5, la activación de PD-1 en la superficie de las células T, ocurre por la interacción con sus ligandos presentes en la membrana de otra célula, tal como las células dendríticas o macrófagos. PDL1 se expresa en la superficie de macrófagos y células dendríticas en respuesta a activación por LPS o GM-CSF o sobre células T y B activadas. También puede expresarse en muchas otras estirpes celulares. Mientras que PDL2 parece sólo expresarse en células dendríticas y algunas células tumorales [52].

PD-1 está constituido por tres regiones: una región extracelular similar a la cadena variable de inmunoglobulina (IgV), una región transmembranal y una región citoplásmica (Figura 4), que contiene dos sitios de fosforilación tipo ITIM. Esto último supone que la activación de PD1 puede ocasionar la inhibición de las señales desencadenadas por TCR. Consistente con esto, se reconoce que la fosforilación de Tyr lleva al reclutamiento de las fosfatasas SHP-1 y SHP-2, los cuales inhibirán la fosforilación de los sitios ITAM presentes en las cadenas del TCR. Se asume también, que la activación de PD1 favorece la función de las proteínas E3-ligasas CBL-b y CBL-c [51].



**Figura 5. Estructura general de PD-1 y sus ligandos.** Tomado de Vargas-Rojas, 2008 [51].

PD-1 al interactuar con sus ligandos, además de inhibir la activación del TCR, envía señales intracelulares que se traducen en la disminución de la producción de citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-2. Esta vía ejerce un efecto directo sobre la diferenciación y supervivencia celular por la inhibición temprana de las señales de activación a través de CD28 o, de manera indirecta, por medio de IL-2. Tanto CD28 como IL-2 promueven la expansión y supervivencia natural a través de efectos anti-apoptóticos en el ciclo celular y sobre la activación de los genes de citocinas [52].

Por su parte, la expresión de PD-1 y sus ligandos está regulada por citocinas tales como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-7, IL-10 e IL-15 (PD-L1) y el factor estimulante de colonias granulocitos y macrófagos (PD-L2) [53]

En 1999, Nishimura y colaboradores trabajando en un modelo murino deficiente de PD-1, observaron el desarrollo espontáneo de una enfermedad renal similar a la glomerulonefritis lúpica de inicio tardío, por lo cual, concluyeron que la deficiencia de PD-1 aceleraba o desencadenaba la autoinmunidad. Este fue el primer estudio en donde se evaluó el rol que jugaba PD-1 en la tolerancia y autoinmunidad [54]. En un estudio del año 2004, se observó una asociación significativa entre el polimorfismo 7146G-A en el gen de PD-1 con el desarrollo de Lupus Eritematoso en población europea y mexicana (factor de riesgo 3.5,  $p < 0.009$ ) [55].

En el caso particular de la AR (Tabla III) se han descrito algunos estudios donde se evaluó la asociación de PD-1<sup>+</sup> en pacientes con AR. Mientras que un estudio genético mostró una asociación significativa entre alteraciones de PD-1 y pacientes con Factor reumatoide y

epítoto compartido. Sin embargo, los estudios de fenotipificación de muestras sanguíneas o de líquido sinovial no son consistentes, con respecto al incremento de células PD-1<sup>+</sup> en sangre periférica, su acumulación en el espacio sinovial o incremento en ambos compartimentos. Por otro lado, es notablemente más claro el hecho de que la presencia más importante de PD-1 se encuentra en células T con fenotipo CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>.

Tabla III. Estudios clínicos de asociación entre células PD-1 y AR.

Tipo de estudio	Metodología	Muestra	Observación	Referencia
Genético	1,175 pacientes genotipificados para PD-1.3 A/G SNP	ADN	Asociación con pacientes FR- y EC- (OR 1.75)	[56] Suecia.
Inmunológico	375 pac. AR temprana; niveles séricos de sPD-1	Suero	Correlación entre niveles de sPD-1 y DAS28, HAQ, FR, aCCP	[57] Dinamarca.
FACS	80 pac AR, nivel PD-1 en células CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup>	Células T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup>	Disminución de PD-1 en células de sangre y correlación con actividad clínica.	[58] China.
FACS	31 pac AR, % y IMF PD-1 en células CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup>	Células de sangre periférica	Incremento en células PD-1 <sup>+</sup> en CD4 y CD8, vs osteoartritis o control.	[59] Polonia
Transcriptómica	Nivolumab (anti-PD-1 antagonista)-responsive genes y transcriptómica	Tejido sinovial y células T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup>	Incremento expresión PD-1 en sinovio y células CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> .	[60] Australia.
FACS	37 pacientes AR, niveles de PD1, Tim3 y CD4, DAS28 y citocinas	Células de sangre periférica	Incremento de células PD-1 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> y PD-1 <sup>+</sup> Tim3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> mayor en pacientes y correlacionó con DAS28	[61] Irán.
Inmunohistoquímica	Evaluación niveles expresión PD-1/PDL-1 en tejido sinovial	Tejido sinovial y células infiltradas	Aumento de PD-1 y de PDL-1 en pacientes. Nivel de PDL-1 correlacionó con FR y células infiltradas	[62] Japón.
FACS y ELISA	Niveles de PD1+CD4+CXCR5+, IL-21 en humanos y ratones. Papel de Células T foliculares	Muestras de sangre de pacientes y modelo murino	Mayor presencia de fenotipo PD1 <sup>+</sup> en pacientes y modelo ratón	[63] China
FACS	56 pacientes AR temprana de cél T foliculares periféricas (Tpf)	PBL de pacientes. Evaluar CD4 <sup>+</sup> CXCR5 <sup>+</sup> PD-1 <sup>high</sup>	Células Tpf son mayores en pacientes y los niveles disminuyen en relación a la actividad	[64] España

AR, artritis reumatoide; ADN, ácido desoxirribonucleico; PD-1.3 A/G SNP, polimorfismo en gen PD-1.3 de A por G; FR, factor reumatoide; EC, epítoto compartido; OR, relación de momios; sPD-1, forma soluble de PD-1; DAS28, puntaje de actividad clínica; HAQ, puntaje de discapacidad; aCCP, autoanticuerpo anti-péptido cíclico citrulinado; FACS, citometría de flujo; PDL-1, ligando 1 de PD-1; ELISA, ensayo inmunoenzimático cuantitativo; PD-1<sup>high</sup>, nivel de expresión alta de PD-1.

Adicionalmente, la expresión de PD1 parece incrementarse sobre células CD8 en procesos de infección viral crónicos (CMV, HIV), pero no así en infecciones agudas. Su bloqueo selectivo parece incrementar la función de células CD4 y CD8. Por otra parte, con empleo de la técnica de citometría de flujo, se observó un incremento en la expresión de PD-1 en células CD16 (monocitos), pero no en células dendríticas. Se sugirió que la sobreexpresión en monocitos depende de la activación de las rutas de TLRs y coincide con

el incremento de IL-10 (ref). Por otro lado, se sugiere que la población de células CD8/CD122/PD1 de ratón tiene función de inhibición de la respuesta T por un mecanismo dependiente de IL-10.

Múltiples estudios sugieren que PDL1 se sobreexpresa en varios tipos de tumores, por lo cual se sugiere que la vía de PD1 es uno de los principales mecanismos para inhibir y evadir la respuesta inmune tumoral [52].

### 2.3. CCR6

Este gen codifica un miembro de la familia de receptores de quimiocinas beta, se predice que es una proteína transmembrana de siete similares a los receptores acoplados a la proteína G. El gen se expresa preferentemente en células dendríticas inmaduras y células T de memoria. Se ha demostrado que este receptor es importante para la maduración del linaje B y la diferenciación de las células B impulsada por antígenos, y puede regular la migración y el reclutamiento de las células B y T durante las respuestas inflamatorias e inmunológicas. Alternativamente, se han descrito variantes de transcripción empalmadas que codifican la misma proteína para este gen [65].

El único ligando conocido para CCR6 es la quimiocina CCL20, que se expresa en gran medida en los sitios de inflamación, incluida la articulación sinovial inflamada por Artritis Reumatoide. Tras la unión de CCL20, las células Th17 CCR6<sup>+</sup> se activan y migran a lo largo del gradiente de CCL20 hacia el espacio sinovial de la articulación [65, 66].

En la Tabla IV se resumen algunos de los estudios clínicos que evalúan la asociación entre CCR6/ CCL20 con pacientes con AR. En estudios de asociación genética realizados en países asiáticos se observó una importante relación entre polimorfismos de CCR6, el incremento de IL-17 y el desarrollo de la AR. Algo semejante ha sido observado en su papel como receptor específico de la quimiocina CCL20/MIP3alfa, ya que mientras ésta se incrementa en células sinoviales, CCR6 se incrementa tanto en células sinoviales como células mononucleares infiltradas. Por su parte, también se observado el fenotipo CCR6<sup>+</sup> en células Th17, Tregs, células B y osteoblastos, sugiriendo su participación en los eventos de infiltración sinovial, activación y diferenciación celular.

En condiciones normales, las células Th17 CCR6<sup>+</sup> y sus citocinas inducen y activan directa o indirectamente a los neutrófilos y organizan la eliminación de hongos y bacterias extracelulares. Sin embargo, las células Th17 CCR6<sup>+</sup> y la sobreproducción de sus citocinas

características se asocian con inflamación persistente y enfermedades autoinmunes, como la Artritis Reumatoide. Actualmente, se identifica una amplia gama de moléculas efectoras, receptores de superficie y factores de transcripción que participan en la función efectora de las células Th CCR6<sup>+</sup> [67, 68].

Tabla IV. Estudios de relación entre CCR6 y AR

Tipo de estudio	Metodología	Muestra	Observación	Referencia
Expresión sinovial	ELISA para CCL20 y RT-PCR para CCR6	Biopsia y líquido sinovial pac	Incremento expresión en células infiltradas de pacientes.	[69] Japón
Expresión y ensayos de quimiotaxis	ELISA, PCR y FACS	Líquido sinovial y sangre periférica	Incremento de CCL20 y expresión de CCR6, cél. CD4+CD45RO+CCR6+. Correlación negativa de CD3+CCR6+ con edad.	[70] EUA
Ensayos de expresión ARN	PCR	Células B de sangre periférica de pacientes AR, LES y OA	Incremento en expresión de células CXCR3, y disminución de CXCR5 y CCR6. Diferencias entre enfermedades.	[71] Alemania
Ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en modelo murino de Artritis	FACS, IHQ, ensayos diferenciación, etc.	Modelo murino de Artritis, células Th17	Células Th17 mostraron expresión de CCR6. Anti-CCR6 bloqueó inducción de artritis. Incremento expresión CCL20.	[72] Japón
Ensayos de expresión e IHQ	IHQ, PCR y ELISA	Biopsias sinoviales de pacientes AR	Incremento de CCR6 y CCL20 en osteoblastos de pacientes. Incremento de CCL20 precede diferenciación a osteoclastos.	[73] Italia
Ensayos de IHQ	IHQ	Biopsias sinoviales de pacientes con AR	Incremento de CCR6 y CCL20 en osteoblastos. Incremento de CCR6 en PBL infiltradas. CCL-20 incrementó proliferación osteoblastos.	[74] Italia
Ensayos de estimulación de medio condicionado	FACs, ELISA y ensayos de quimiotaxis	Medio condicionado de fibroblastos sinoviales estimulados para evaluar efecto quimiotáctico	Incrementó secreción CCL20 y migración de Th17 CCR6+.	[75] Japón
Estudio de asociación genético	Estudio asociación de 7069 pac AR (6q27)	ADN de pacientes	Asociación significativa CCR6 y liberación IL-17.	[76] Japón
Estudio FACS	Estudio comparativo sangre y sinovio e pac AR y OA	PBLs aisladas de sangre y biopsias sinoviales	Incremento de CD4+CCR6+ tanto en sangre como sinovial.	[77] Japón
Estudio de asociación genético	Estudio asociación de 7069 pac AR (6q27)	ADN de pacientes	Asociación significativa CCR6. Factor de riesgo para mujeres, pero de protección en hombres.	[78] Singapur
Ensayos FACS en pacientes y en modelo murino	Evaluación de CCR6 en Tregs de pacientes y niveles de TregsCCR6+	Sangre de pacientes y tejidos de modelo murino	Incremento de Tregs CCR4+ y CCR6+ tanto en pacientes como en ratones.	[79] China

Ensayos FACS en pacientes	27 pacientes aCCP+ y 27 pacientes aCCP-	Sangre de pacientes aCCP+ y aCCP-	Pacientes aCCP+ mostraron incremento de CCR6 y CXCR3. CCR6+ se incrementa en Th17 y Th22.	[68] Países Bajos
Estudio de asociación genético	377 pac AR, evaluación CCR6 y DPP4 SNP	Muestras de pacientes	Asociación significativa de DPP4 y CCR6 con AR. Interacción genética entre DPP4 y CCR6.	[80] China
Estudio FACS en pacientes	Evaluación fenotipo celular en pacientes	Muestras de sangre y líquido sinovial de pacientes	Incremento de CCR6, CXCR5 en cels citotóxicas y CD32B en naive y T cells en líquido sinovial.	[81] Croacia
Ensayo en modelo murino	Sorting, PCR y FACS de células de ratón	Muestras de sangre y tejidos de ratones artríticos	Incremento de células linfoides innatas ILC CCR6+, en conjunto con incremento de IL-17.	[82] Japón
Estudio citometría de masas y secuenciación	Evaluación de fenotipo de cél B de pacientes	Muestras de sangre pacientes	Tendencia de incremento de CXCR5 y CCR6 en cél B de pacientes aCCP+.	[83] Suecia

AR, artritis reumatoide; ADN, ácido desoxirribonucleico; FR, factor reumatoide; CCL20 (MIP-3alfa), ligando para CCR6; aCCP, autoanticuerpo anti-péptido cíclico citrulinado; FACS, citometría de flujo; ELISA, ensayo inmunoenzimático cuantitativo; Tregs, células T reguladoras.

#### 2.4. Posible papel de CCR6 y PD-1 como biomarcadores de AR

Como se puede observar en las Tablas II y III, las proteínas CCR6 y PD-1 podrían ser biomarcadores con notable utilidad para el caso de los pacientes con AR. Mientras en el caso de PD-1, debido a su relación funcional cercana con la activación del TCR de los linfocitos T, parecería ser un elemento que podría definir el estado de activación de las estirpes celulares proliferantes o infiltradas en el espacio sinovial. Asimismo, dado que se ha observado una correlación con la actividad clínica o con etapas de la enfermedad, podría servir como marcador del pronóstico o respuesta al tratamiento. Además, de esto, se ha observado que su incremento en pacientes con AR, no sólo se observa a nivel sinovial, sino se puede observar en muestras de sangre periférica, lo que nos sugiere que su estimulación es un evento sistémico y que, por lo tanto, puede ser monitoreado en sangre periférica.

Por el otro lado, CCR6, junto con otros receptores para quimiocinas parece jugar un papel primordial en la quimiotaxis celular de células mononucleares activadas y osteoblastos. De esa manera, podría ser un marcador de los fenotipos celulares incrementados durante la enfermedad. En particular varios estudios clínicos lo vinculan a los fenotipos de células Th17, Tregs, células B y osteoblastos, por lo cual parece ser un participante importante en favorecer el tropismo hacia el espacio sinovial. Sin embargo, aunque se ha observado su presencia en muestras de sangre periférica, han sido menos los estudios donde observan su incremento en células de sangre periférica [58, 68, 83].

### 3. ARTRITIS REUMATOIDE EN POBLACIONES INDÍGENAS

#### 3.1. Estudios previos

Las Enfermedades Reumáticas (ER) producen gran impacto funcional, socioeconómico, familiar e individual, en la población general; sin embargo, estas no son consideradas un problema de salud pública. Como destacan Wolfe y Gabriel, ni la Organización Mundial de la Salud (OMS), ni las instituciones locales de salud toman en cuenta a las ER dentro de las enfermedades no comunicables [84, 85]. Además hay que considerar que estas enfermedades frecuentemente (27-50%) se presentan en conjunto con otras enfermedades [87].

Debido a su naturaleza como enfermedad inflamatoria sistémica, la AR compromete significativamente la capacidad funcional y la calidad de vida de los pacientes que la padecen, siendo una situación más dramática en poblaciones vulnerables como las comunidades indígenas. Sin embargo, han sido relativamente pocos estudios realizados para conocer la prevalencia de esta enfermedad en comunidades indígenas en el mundo, mostrando resultados muy dispares, como se muestra en la Tabla V. Mientras que se han reportado por encima del 3% en algunas etnias americanas, en poblaciones asiáticas o de Africa los índices de prevalencia están por debajo del 0.25%. Por otro lado, en estudios realizados en EUA con poblaciones étnicamente diferenciadas han observado que los hispanos y los afroamericanos tienen una menor prevalencia de AR, aunque su daño en las articulaciones es más grave. Además, existen diferencias clínicas según el tipo de trabajo, educación y situación social de los pacientes [88].

Tabla V. Estudios en poblaciones indígenas con AR

Tipo estudio	n	Población	Observaciones	Referencia
Prevalencia (cuestionario de síntomas tipo AR)	-	Alaskan Yupik, Russian Chukchi, Siberian Skimo, Alaskan Inupiat	Mayor prevalencia en Alaskan Inupiat que Yupik. Se sugiere diferencias genéticas y ambientales. Prevalencia: 0.62-1.78	[89]
Estudio de revisión bibliográfico	-	Aborígen australiano	Prevalencia muy baja: casos vinculados a mestizaje	[90]
Estudio de revisión bibliográfico	-	Aborígen nativo canadiense y esquimal	Alta prevalencia de enfermedades reumáticas, con características: seropositiva, epitopo compartido, actividad severa y con manifestaciones extra-articulares. Relación con ancestría y migración.	[91]

Estudio clínico y de prevalencia	107 pac pakistatí vs 107 europeos	Comparación: población pakistani vs europea (UK)	Similar nivel de inflamación, menos daño pero mayor dolor (discapacidad) en indígenas	[92]
Estudio de revisión bibliográfico	-	Poblaciones sub-saharianas	De manera gral., se asume que muestra un perfil menos severo de la enfermedad en los pocos casos. Prevalencia: 0-0-9%, con variaciones importantes entre regiones	[93]
Estudio de revisión bibliográfico	-	Poblaciones de Africa del Sur	No se muestran cifras pero se asume que el epitopo compartido explica la prevalencia de RA. Prevalencia del haplotipo HLA Drb1 04*	[94]
Estudio de revisión bibliográfico		Poblaciones nativas americanas:	Alta prevalencia de seropositividad, erosiones, inflamación y epitopo compartido. Revisión bibliografica. Mayor prevalencia reportada en poblaciones Tlingit, Yakima, Pima, and Chippewa Indians (2.6-8.2). Otras poblaciones mostraron prevalencias similares a caucasicos	[95]
Estudio prevalencia	34	Poblaciones nativas sudeste de Alaska	Prevalencia de HLA-DRB1*1402. Mayor riesgo para 5 amplicons de 85 SNPs identificados	[96]
Estudio clínico y prevalencia	106	Poblaciones nativas Alaska	En un análisis multivariado, el factor más asociado con prescripción a DMARD fue la visita anual con reumatólogo. El cuidado del paciente es mejor para aquellos que van al reumatólogo. 93 y 90% con prescripción DMARD y MTX, respectivamente. 16% con radiografías	[97]
Estudio clínico y de prevalencia	85	Niños de Zambia	AR juvenil. Predominantemente poliarticular, seronegativo (35%).	[98]
Estudio serológico	82	Nativos norteamericanos	29 % anti-PAD4 positivo, 27% aCCP positivo. Positividad asociada a tiempo con enfermedad. Ningún control caucásico o familiar presentaron anti-PAD4.	[99]
Estudio clínico y prevalencia	189	Pacientes chilenos Mapuches y no	Bajos ingresos asociado (OR 3.47) e identidad Mapuche (OR 2.48) con discapacidad. Otras variables potencialmente relacionadas: edad, género y residencia.	[88]
Estudio clínico y de prevalencia	380	Población raramuri	Prevalencia de 0.5 para AR, y de 10.5 para enfermedades musculoesqueleticas. Factores de riesgo: edad, antecedentes y HAQ.	[100]
Estudio clínico y de prevalencia	1537	Poblaciones Warao, Kari'na, y Chaima de Venezulea	Prevalencia de AR 1.1%, siendo la población de Chaima la mas alta para AR (2.0%)	[101]
Estudio clínico y de prevalencia	1061	Poblaciones Chontal y Mixteco	Prevalencia de AR 0.3% y pevalencia alta (>16% para enfermedades musculoesqueleticas).	[102]
Estudio de prevalencia	95	Poblaciones nativas canadienses	Mayor prevalencia de positividad para FR, aCCP y autoanticuerpos vs antígenos carbamilados.	[103]
Estudio de prevalencia	1523	Población Maya-Yucateco	Prevalencia de AR en 1.1% población. Factores de riesgo para enfermedades reumáticas son edad mayor, ser mujer y trabajo físicamente demandante	[104]
Estudio de prevalencia	1656	Población Qom, Rosario, Argentina	Prevalencia de AR en 2.4% población, prevalencia en enfermedades reumáticas en 29.6%	[105]
Estudio epigenético	18	Población nativa canadiense y familiares sin síntomas	Alteraciones en perfil de expresión miRNA en pacientes, sobretodo marcador miR-103a-3p. Alteración parcial en familiares sin síntomas.	[106]

Estudio prevalencia	4877	Población Cuenca, Ecuador	Prevalencia de AR 3.3%, alta prevalencia de discapacidad. Factores de riesgo: edad, mujer, bajos ingresos, baja educación y residencia rural	[107]
Estudio genético	344	Población nativa canadiense	AR/aCCP+ se asoció con HLADRB1*1402, SNP His13betaSer sugiriendo que esta variación amplía la capacidad de presentación de péptidos citrulinados	[108]
Estudio clínico	90 indígenas vs 1400 no-indígenas	Población nativa canadiense	Estado clínico basal peor para indígenas. Ambos presentan adecuada respuesta al tratamiento, pero la pendiente de cambio es más lenta para indígenas. Auto-reportan mayores consecuencias (discapacidad y estilo de vida) en pacientes indígenas	[109]
Estudio clínico	90 indígenas vs 1400 no-indígenas	Población nativa canadiense	DAS28 basal mayor en indígenas (6.1) y respuesta más lenta a TX biológico. No hay cambio en VSG y sólo 13% alcanzaron remisión. 4 veces más posibilidad de hospitalización de paciente indígena. Severas disparidad en respuesta al tratamiento en pacientes indígenas	[110]
Estudio clínico	40 pacientes	Población Qom, Rosario, Argentina	Prevalencia del 3%, DAS28 basal de 4.8, 30 meses desde el inicio de síntomas. 67.7% con actividad severa. Poca adherencia, siendo principal factor la migración	[111]
Estudio epidemiológico	6155 pacientes de diferentes poblaciones	Poblaciones indígenas en latinoamerica	Prevalencia de enfermedades musculoesqueléticas 34% en latinoamerica, con grandes variaciones entre poblaciones. AR promedio: 1.3%	[112]
Estudio genético		Poblaciones nativas canadienses	Identificación de 74 alteraciones de metilación del ADN. Correlación negativa de metilación de C6ORF10, con factores de riesgo.	[113]
Estudio clínico y de prevalencia	374	Poblaciones nativas de Alaska y Canadá	Prevalencia de artritis inflamatoria de 4.8. Aunque el 30% son seropositivos: FR+/aCCP+, 39% evoluciona a estado seronegativo en 5 años.	[114]

A pesar de las grandes variaciones en la prevalencia y los factores de riesgo, las enfermedades reumáticas son una amenaza para la salud pública en todo el mundo, pero aún más en los países en desarrollo. Considerando el impacto diferencial de las enfermedades reumáticas en estos países, la Liga Internacional de Asociaciones de Reumatología (ILAR), junto con la Organización Mundial de la Salud (OMS), presentó el Programa orientado a la comunidad para el control de enfermedades reumáticas (COPCORD) destinado a reconocer, prevención y control de enfermedades reumáticas. El programa también se utiliza para generar datos epidemiológicos confiables de comunidades con recursos limitados [115]. En Chile, por ejemplo, no se ha estudiado a profundidad la relación entre el grupo étnico y la prevalencia de enfermedades musculo esqueléticas, sin embargo, se estima que 8 de cada 10 mujeres mapuche mayores de 45 años padecen osteoporosis [88].

Debido a la necesidad de datos propios acerca de las enfermedades reumáticas en Latinoamerica, y dada su dimensión poblacional en esta región surge en el año 2009 el Grupo

Latino Americano De Estudio de Enfermedades Reumáticas en Pueblos Originarios (GLADERPO). En México, se han realizado estos estudios en poblaciones indígenas Maya-Yucateco, Mixtecos, Chontales y Rarámuris. participantes (Tabla IV). Mientras que también se han evaluado la prevalencia de enfermedades reumáticas y AR en poblaciones indígenas de Suramérica, como Argentina, Chile, Ecuador, Colombia y Venezuela. Como se puede observar en la Tabla V la prevalencia de enfermedades reumáticas es significativamente elevada (>30%), mostrando la AR una frecuencia muy variable desde 3 al 0.3%. Sin embargo, debido a su notable efecto sobre la discapacidad y calidad de vida, la AR es una enfermedad con mayor impacto en poblaciones vulnerables como las indígenas, como algunos estudios comparativos se han realizado con poblaciones nativas canadienses y de Alaska. Por otro lado, aunque se ha avanzado mucho en la descripción de los problemas musculoesqueléticos en las poblaciones indígenas, se desconoce en gran medida las características fisiopatológicas y de respuesta al tratamiento de estos pacientes. En gran medida, como consecuencia de su vulnerabilidad, la adherencia al tratamiento farmacológico es de bajo a pobre en estos pacientes, haciendo más complicado su pronóstico clínico (Tabla V).

En ese escenario es que se iniciaron trabajos de colaboración entre el Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León y la fundación Esquipulas A.C. Centro Asistencial para Indígenas. Esquipulas como fundación inicio sus operaciones a fines de 1996, en la ciudad de Monterrey, N.L., teniendo como objetivo el apoyo a las comunidades indígenas del Estado de Chiapas en el área de la salud, así como otras áreas que llevan a buscar una mejora en su calidad de vida y rescatar sus valores, respetando su cultura y costumbres. Para ese fin, la Clínica Esquipulas, ubicada en la ciudad de San Cristóbal de las Casas, Chiapas, brinda atención a 16 comunidades en diferentes partes del Estado, en las que carecen de servicios de salud. Al momento actual, la Clínica lleva ofreciendo servicio sanitario por más de 20 años a pobladores exclusivamente indígenas, lo que ha permitido generar una confianza por pacientes que incluso realizan recorridos de 8-10 hrs desde sus comunidades.

En el año 2017 debido al aumento de la demanda de atención se detectó que existe una problemática de salud musculoesquelética en la población indígena. Aunado a lo anterior, se realizó un estudio exploratorio donde ofrece atención la Clínica Esquipulas, con el objetivo de detectar malestares musculoesqueléticos, enfermedades reumáticas, enfermedades dermatológicas y co-morbilidades; encontrándose que el 90.4% de los adultos manifestaron tener dolor musculoesquelético crónico; de los cuales el 60% cumplió criterios

para una enfermedad reumática, llamando la atención la prevalencia alta de poliartritis y Artritis Reumatoide. La presencia de estas enfermedades se asoció a tener otra enfermedad crónica y al uso de leña para cocinar. Por su parte, en un estudio piloto de prevalencia, empleando metodología COPCORD, en una comunidad de Los Altos de Chiapas, entre 2016-17, sugirió una prevalencia incluso mayor al 6% [116]. Sin embargo, por ajenas al grupo de investigación, no se pudo completar los estudios, ni dar seguimiento clínico a los pacientes.

Por otro lado, en un estudio comparativo con pacientes con AR del Estado de Morelos, nativos y caucásicos canadienses, observamos que los pacientes americanos tuvieron mayor actividad clínica, menor respuesta al tratamiento con fármacos modificadores de la enfermedad y menor tasa de remisión, en comparación con canadienses caucásicos [117].

Por otro lado, varios estudios moleculares y clínicos han sugerido que la AR es una enfermedad muy heterogénea tanto en los factores que llevan a su desencadenamiento, su evolución clínica y su respuesta a medicamentos. En base a esto, ha cobrado importancia la identificación de biomarcadores de la enfermedad, ya que permitiría personalizar su tratamiento y limitar el desarrollo de daños estructurales en el paciente. En ese contexto, que el Laboratorio de Citocinas y Autoinmunidad adscrito a la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, con experiencia en el área de búsqueda de biomarcadores en pacientes reumáticos, fue invitado a participar en la caracterización de los pacientes con AR de comunidades indígenas de los Altos de Chiapas. Los resultados del presente estudio constituyen los primeros intentos de realizar una caracterización inmunológica de la enfermedad reumática en las poblaciones indígenas del sureste mexicano.

### **3.2. Posibles factores de riesgo**

La AR afecta a casi el 1% de la población adulta en todo el mundo, pero su prevalencia e incidencia difieren entre las áreas geográficas y los países. La prevalencia de la AR es mayor en el norte de Europa y América del Norte que en el sur de Europa, África y los países en desarrollo. En parte, tales diferencias se han explicado por la edad más joven de la población en las naciones de ingresos bajos a medios y por las variaciones entre los grupos étnicos y urbanos versus los rurales. Las diferencias geográficas en la prevalencia de la AR pueden ser el resultado de una combinación de características individuales, así como factores socioeconómicos, ambientales y culturales. Los factores individuales incluyen el tabaquismo,

la terapia hormonal, la dieta y la obesidad, el sexo femenino, las variables reproductivas femeninas, las infecciones a temprana edad, las malas condiciones de higiene, el mayor crecimiento en la infancia, el estrés moderado en el trabajo y la exposición a insecticidas y pesticidas agrícolas. Curiosamente, el efecto de estas variables en la prevalencia de AR no necesariamente resulta de la agrupación geográfica, sino de factores discretos. Los factores ambientales incluyen los relacionados con la industrialización, la transición demográfica y la urbanización [118].

Alarcón y colaboradores, en un estudio realizado en el año 2014, proponen, además, que existen factores tales como el grupo étnico y la posición socioeconómica que contribuyen a la falta de igualdad en la atención médica y que impacta directamente a la población [88]. Por su parte, en varios estudios epidemiológicos en poblaciones indígenas de norteamérica, México y Suramérica se ha identificado que una alta prevalencia alta a padecer enfermedades reumáticas y a observar una respuesta terapéutica menor que los pacientes caucásicos, lo que podría sugerir la existencia de factores de susceptibilidad genética y epigenética propios de estas poblaciones.

#### 4. JUSTIFICACIÓN.

La Artritis Reumatoide es una enfermedad autoinmune crónica degenerativa que se presenta en una de las etapas más importantes en la vida de un individuo, ya que tiende a desarrollarse principalmente entre los 40 – 60 años de vida, que es la etapa productiva de un individuo. Se considera una enfermedad de alto impacto en la vida de los individuos que la padecen, ya que al no contar con un diagnóstico oportuno de la enfermedad el riesgo de que pase desapercibida se incrementa de forma alarmante, impidiendo así que el paciente reciba el tratamiento adecuado en una fase temprana de la enfermedad, lo cual se traduciría en la reducción considerable de los síntomas y de la mayoría de las deformaciones radiológicas que conlleva la enfermedad en las etapas de mayor daño de la misma, mejorando así de forma indudable la calidad de vida del paciente.

Por tanto, múltiples estudios han mostrado que la respuesta inmunológica constituye uno de los elementos centrales para direccionar el curso de la enfermedad. En este sentido, el microambiente de señales químicas derivadas de células inmunes (citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento) y el perfil de las moléculas receptoras van a modificar el curso de la enfermedad. Por lo tanto, una manera de evidenciar que los mecanismos biológicos podrían ser diferentes entre dos grupos de pacientes (indígenas contra urbanos) sería evaluando los niveles de marcadores de inmunorregulación en la superficie de linfocitos T (CD4 y CD8). Estos estudios nos permitirán un mejor entendimiento de los procesos inmunológicos que se llevan a cabo en la enfermedad, así como también, permitirán dar paso al posible encuentro o desarrollo de nuevos marcadores moleculares a través de los cuales sea posible el diagnóstico temprano y oportuno o, de nuevas moléculas que puedan ser utilizadas en el tratamiento de la enfermedad para brindar una mejor calidad de vida al paciente. Asimismo, estos estudios constituyen los inicios de estudios inmunológicos para poder caracterizar la AR presente en poblaciones indígenas, que en base con su seguimiento clínico parece mostrar un perfil inflamatorio más agresivo que otras poblaciones urbanas de nuestro país. En ese sentido, los resultados de este estudio permitan abonar en el entendimiento porque los pacientes indígenas presentan una evolución inflamatoria más agresiva y/o una menor respuesta al tratamiento “modificador de la enfermedad”.

## 5. PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿El porcentaje de células T con fenotipo CD45<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> y CD45<sup>+</sup>PD1<sup>+</sup> será similar o diferente entre los pacientes indígenas y urbanos con AR?

## **6. HIPÓTESIS**

### **6.1. Hipótesis alternativa.**

La presencia relativa o el porcentaje de células CD45<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> y CD45<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> será significativamente mayor en sangre periférica de pacientes con Artritis Reumatoide en comparación con individuos sanos y permitirá diferenciar entre pacientes indígenas de Los Altos de Chiapas, pacientes urbanos y sujetos sanos.

### **6.2. Hipótesis nula.**

La presencia relativa o el porcentaje de células CD45<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> y CD45<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> no será significativamente mayor en sangre periférica de pacientes con Artritis Reumatoide en comparación con individuos sanos y no permitirá diferenciar entre pacientes indígenas de Los Altos de Chiapas, pacientes urbanos y sujetos sanos.

## 7. OBJETIVOS

### 7.1. Objetivo general.

Determinar y comparar la presencia relativa y el porcentaje de células CD45<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>/CCR6<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>/CCR6<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>/PD-1<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>/PD-1<sup>+</sup> en muestras de sangre periférica de pacientes indígenas, pacientes urbanos con Artritis Reumatoide.

### 7.2. Objetivos específicos.

1. Generar banco muestras celulares de sangre periférica de pacientes con AR de indígenas del municipio de Chenalhó (Chiapas) y urbanos de Morelos; así como de sujetos sanos.
2. Estandarización de técnica por citometría de flujo para evaluación del fenotipo de células CD45<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>/CCR6<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>/CCR6<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>/PD-1<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>/PD-1<sup>+</sup>.
3. Determinar y comparar la presencia relativa y el porcentaje de células CD45<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>/CCR6<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>/CCR6<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>/PD-1<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>/PD-1<sup>+</sup>, en sangre de pacientes con Artritis reumatoide de comunidades indígenas de Chiapas, pacientes urbanos con Artritis reumatoide del estado de Morelos y sujetos sanos.
4. Evaluar la posible correlación estadística entre los niveles los fenotipos celulares y los parámetros clínicos de los pacientes con AR.

## **8. MATERIAL Y METODOS**

### **8.1. Diseño experimental**

Estudio transversal y comparativo.

### **8.2. Poblaciones de estudio y permisos.**

Se reclutaron pacientes con diagnóstico de AR, de acuerdo con los criterios de ACR/EULAR, 2010, que asisten a su consulta clínica con el reumatólogo. Para el reclutamiento de pacientes indígenas del municipio de Chenalhó y toma de muestras sanguíneas, se realizó en colaboración con personal de la Clínica Esquipulas A.C. (San Cristóbal de las Casas, Chiapas) y del Hospital Universitario de la UANL. Los pacientes urbanos se reclutaron en la Clínica de Artritis Reumatoide del Hospital General de Cuernavaca "José G. Parrés", de los Servicios de Salud de Morelos. Todos los pacientes incluidos en el estudio fueron diagnosticados por reumatólogos certificados y siguieron un tratamiento combinado a base de Fármacos modificadores de la enfermedad convencionales. Asimismo, antes de poderse realizarse, el presente estudio fue evaluado y aprobado por el comité de ética del Hospital General de Cuernavaca Dr. José G. Parres y el comité de ética de Servicios de Salud de Morelos.

Tanto en el caso de los pacientes indígenas como de los pacientes urbanos, posterior a su evaluación reumatológica, se invitó al paciente a donar una muestra de sangre venosa para el estudio inmunológico comparativo.

Las muestras sanguíneas de donadores sanos se obtuvieron en el Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea de Morelos (CETS), a partir de concentrados leucocitario ("buffy coat"), lo que permitió contar con muestras negativas para Hepatitis, HIV, Herpes, Chagas, etc. Estas muestras fueron obtenidas en forma de paquetes leucocitarios (buffy coat). Las muestras de sangre fueron procesadas en condiciones de esterilidad y bioseguridad nivel 2 (Campana de flujo laminar nivel IIA NUAIRE).

### **8.3. Criterios de selección de pacientes.**

Los pacientes se reclutaron en su visita con el reumatólogo en las instalaciones de la Clínica Esquipulas A.C. y en las instalaciones del Hospital General Dr. José G. Parres, del

Estado de Morelos. Posterior a su evaluación reumatológica cotidiana, se invitó al paciente a participar en el protocolo de estudio, de acuerdo a los criterios de selección descritos a continuación. Para lo cual, inicialmente se tuvo que leer y aclarar dudas al paciente previo a la firma del consentimiento informado (ver Anexo 1).

***Criterios de inclusión:***

1. Pacientes con diagnóstico de AR, según criterios de ACR/EULAR, 2010
2. Pacientes mayores de 18 años
3. Pacientes con esquema de tratamiento de al menos 6 meses con FARMES o, en su defecto, recién diagnosticados, aceptar participar en el protocolo.
4. Pacientes con tratamiento menor a 10 mg/día de glucocorticoides.
5. Pacientes que firmen carta de consentimiento informado (Anexo 1).

***Criterios de exclusión:***

1. Pacientes con diagnóstico de otras enfermedades crónicas inflamatorias además de AR.
2. Pacientes embarazadas.

***Criterios de eliminación:***

1. Muestra insuficiente o hemolizada.

Posterior a la firma de la Carta de Consentimiento informado, se colectó una muestra de sangre venosa a los pacientes, en condiciones asépticas, con material nuevo y realizado por un responsable certificado. Las muestras sanguíneas fueron procesadas máximo 4 hrs posteriores a su colecta.

**8.4. Variables evaluadas.**

Independientes:

- Edad
- Género
- Tiempo desde el inicio de síntomas
- Número de articulaciones inflamadas
- Número de articulaciones dolorosas
- Actividad clínica (DAS28/VSG)

- Velocidad de Sedimentación Globular
- Proteína C Reactiva
- Factor Reumatoide

Dependientes:

- CD45<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup>
- CD45<sup>+</sup>/CCR6<sup>-</sup>
- CD45<sup>-</sup>/CCR6<sup>+</sup>
- CD45<sup>+</sup>/PD-1<sup>+</sup>
- CD45<sup>+</sup>/PD-1<sup>-</sup>
- CD45<sup>-</sup>/PD-1<sup>+</sup>

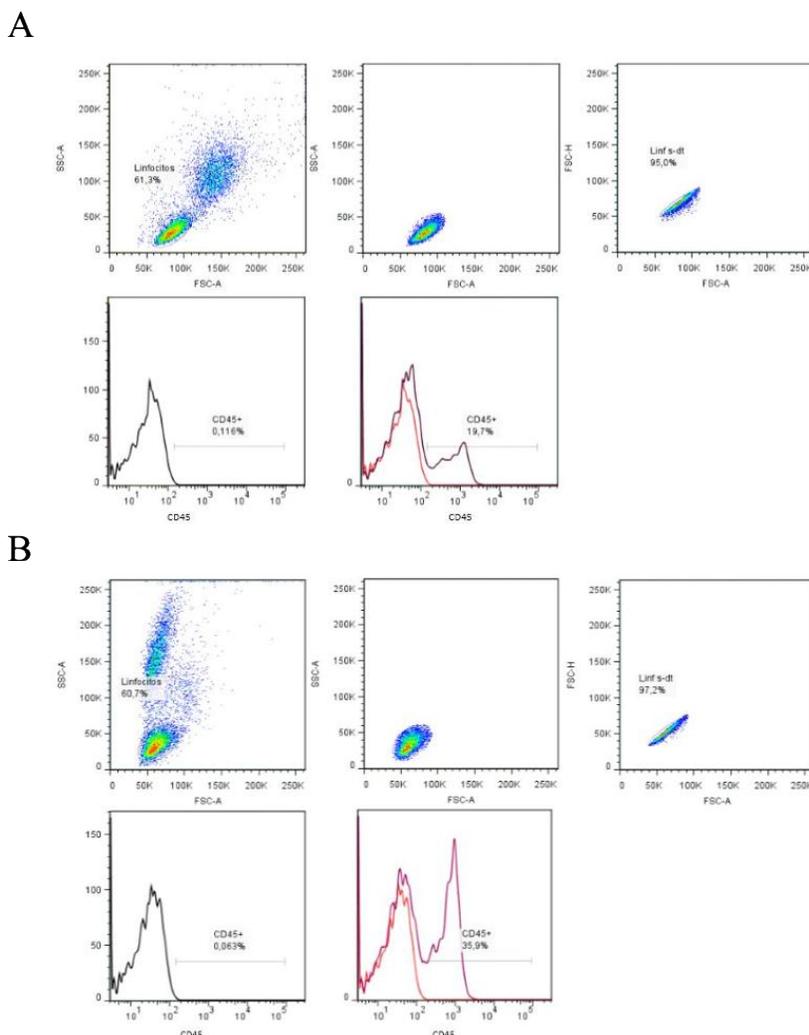
### **8.5. Toma y procesamiento de muestras sanguíneas.**

Las muestras de sangre se recolectaron con vacutainer con EDTA como anti-coagulante (tapón morado, Becton Dickinson) y, el mismo día, se separaron el plasma y el paquete celular. La fracción de plasma fue almacenada a -20 °C hasta su traslado al Laboratorio de Citocinas y Autoinmunidad en Cuernavaca. Mientras tanto, el paquete celular fue procesado para preservar los leucocitos sanguíneos, para lo cual se empleó el protocolo de lisis de eritrocitos estandarizado en nuestro grupo de investigación. Para lo cual, el paquete celular fue lavado 3x con la solución de lisis de eritrocitos (Sigma Aldrich) por períodos de 5 min y lavados 4 con PBS en una centrifuga clínica. Al final, la fracción de leucocitos fue resuspendido en PBS y contado por técnica de azul tripano. Se fijaron en solución de paraformaldehído al 2% final, en 4 alícuotas diferentes y, finalmente, fueron almacenadas a 4C, hasta su envío a Cuernavaca y análisis por citometría de flujo.

En el caso de las muestras colectadas en el Hospital General Dr. José G. Parres fueron procesadas el mismo día, separando la fracción del plasma y almacenándola a -20°C, mientras que a partir del paquete celular, se separó la fracción de células mononucleares, empleando la técnica de Ficoll Paque (Sigma Aldrich). Al término de los lavados con PBS, las células se resuspendieron y contaron por la técnica de Azul tripano. Para su almacenamiento hasta el análisis de citometría, las células se fijaron en solución de paraformaldehído al 2% final, en 4 alícuotas diferentes a 4°C hasta su análisis.

Como se describió anteriormente, las muestras obtenidas de ambas localizaciones fueron procesadas de diferente manera, debido a las condiciones con las se contó en la Clínica

para pacientes indígenas. Con el fin de verificar que evaluaciones similares a pesar de un procesamiento diferente de las muestras sanguíneas, se evaluó el perfil celular de la misma muestra de donador sano y procesada, a la par, por ambos métodos de fraccionamiento: lisis de eritrocitos o purificación de células mononucleares.



**Figura 6. Separación de células de sangre periférica de pacientes urbanos (A) e indígenas (B).** A. Separación de células mononucleares empleando la técnica de Ficoll Paque de las 30 muestras de pacientes. B. Separación de células empleando la técnica de lisis de eritrocitos de las 20 muestras de pacientes indígenas.

En la Figura 6 se observan los perfiles de citometría de las células de sangre procesadas por lisis de eritrocitos y purificación de células mononucleares por Ficoll Paque. Como se observa, mientras que el análisis de tamaño vs. granularidad fue diferente en cada caso, el inmunofenotipo PD-1 vs CD45 fue similar. De esta manera, se confirmó que a pesar de las diferencias en el procesamiento de las muestras sanguíneas, no interfiere en el análisis del inmunofenotipo celular. Como se describió antes, las muestras de donadores

correspondieron a concentrados leucocitarios derivados del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea. Estas muestras fueron procesadas el mismo día de su liberación, mediante la técnica de Ficoll Paque, similar a las muestras de pacientes urbanos con AR.

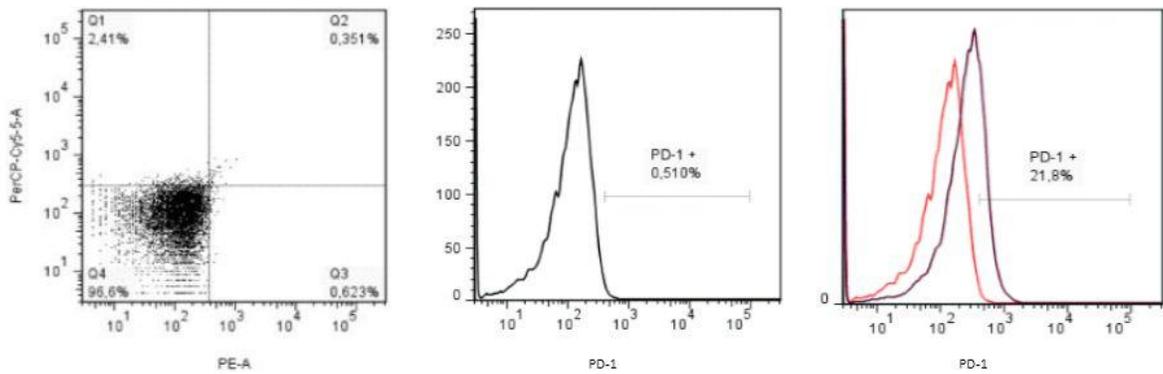
Todas las adquisiciones de células para su análisis por citometría de flujo se realizó en el equipo FACSCanto™ II (Becton Dickinson), con el software FACS DIVA., del Instituto de Biotecnología de la UNAM, a cargo de la Dra. Yvonne Rosnstein y con apoyo técnico de la Dra. Erika Melchy. Finalmente, las gráficas en formato de histograma o de puntos, así como la determinación de los porcentajes y cantidad relativa de marcadores (intensidad media de fluorescencia) fue obtenido por empleo del software FlowJo v. 7.6.

## **8.6. Estandarización de condiciones control para titulación de marcadores CD45, PD-1 y CCR6**

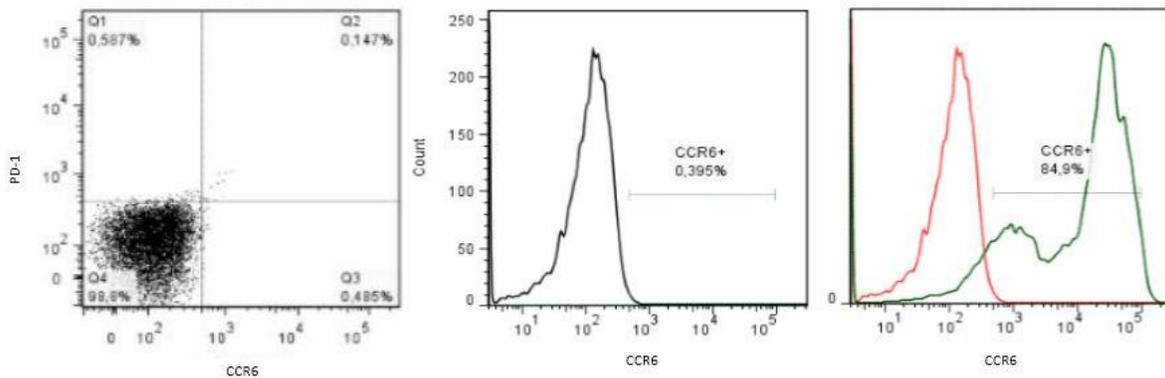
### 8.6.1. Condiciones basales en donadores sanos.

Como se puede observar en la Figura 7 y 8, los niveles basales de PD-1 y CCR6, respectivamente en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de donadores sanos. Para el caso particular de PD-1 se observó un ligero desplazamiento de la fluorescencia hacia la derecha, sugiriendo que una cantidad limitada de células mononucleares eran positivas para este marcador y/o que la cantidad relativa de PD-1 en la superficie celular era baja. Por su parte, para el caso del receptor CCR6 se observó que un desplazamiento de >80 % de las células hacia la derecha sugiriendo que la mayoría de las células eran positivas para este marcador, al tiempo que la cantidad relativa por células (intensidad media de fluorescencia) parece ser alta. Hay que hacer notar la presencia de un subgrupo minoritario de células parecen presentar cantidades menores de CCR6 o que podría tratarse de un artefacto de la técnica.

Estos ensayos se realizaron durante la titulación de los anticuerpos directamente acoplados con los fluoróforos empleados para el resto del estudio: anti-PD-1 acoplado con Ficoeritrina (PE) y anti-CCR6 acoplado con (PerCP-Cy5.5). De estos primeros ensayos se consideró necesario estimular las células mononucleares purificadas para obtener resultados significativos (PD-1) o para descartar posibles artefactos (CCR6) que nos sirvieran como referencia clara en la titulación posterior de los anticuerpos.



**Figura 7. Nivel basal de PD-1 en células mononucleares de donadores.** Los ensayos se realizaron (fijación), bloqueo, incubación con dilución de anticuerpos, (Comparación entre células incubadas con anticuerpos y células sin anticuerpo (autofluorescencia)).

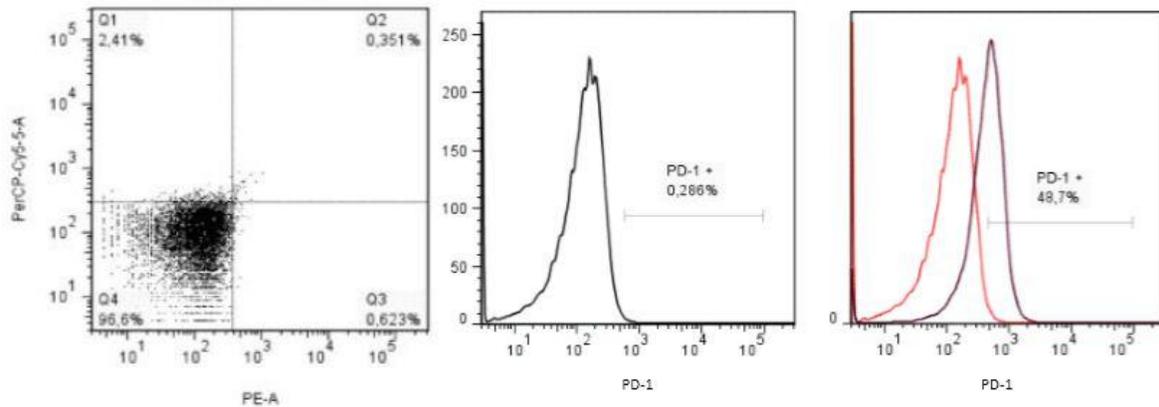


**Figura 8. Nivel basal de CCR6 en células mononucleares de donadores.** Los ensayos se realizaron (fijación), bloqueo, incubación con dilución de anticuerpos, (Comparación entre células incubadas con anticuerpos y células sin anticuerpo (autofluorescencia)).

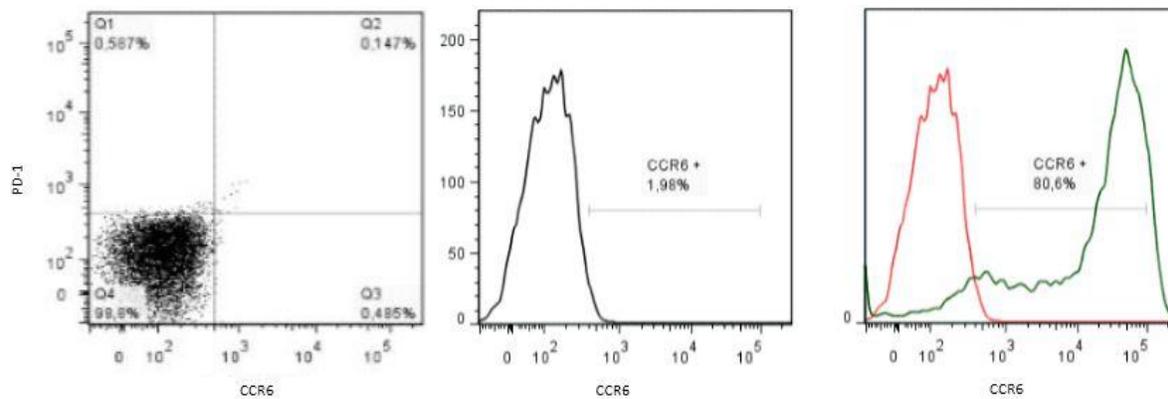
### 8.6.2. Estimulación de CMSP con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA).

Una vez obtenidas las CMSP se mantuvieron en medio RPMI Advanced con 3% de Suero Fetal Bovino (SFB) y 1% de antibiótico durante aproximadamente 24 horas. Posteriormente, se lavaron 2 veces con PBS durante 7 minutos a 1,250 rpm. Una vez terminados los lavados se dejaron ayunando las células durante 2 horas con medio RPMI 2% SFB, después se lavaron nuevamente durante 2 veces con PBS durante 7 minutos a 1,250 rpm. Después, se estimularon en 10 ml de RPMI Advanced con 3% SFB, 1% de antibiótico y 10 mM de PMA durante 24 horas. Una vez cumplido el tiempo de estímulo, se lavaron

nuevamente las células con PBS, se fijaron con 200  $\mu$ l de PFA al 2% a 37°C durante 10 minutos, finalmente se lavaron y prepararon alícuotas de  $1 \times 10^6$  células y se guardaron a 4°C para su uso.



**Figura 9. Niveles basales de PD-1 de células mononucleares de sangre periférica de donadores sanos posterior a 24 hrs de estimulación con PMA.** Se muestran histogramas representativos de perfil de PD-1 de células estimuladas con 10 nM de PMA por 24 hrs, en comparación con perfil de autofluorescencia (células sin anticuerpo). Para estos ensayos se emplearon diluciones de anti-PD-1 de 1:20.



**Figura 10. Niveles basales de CCR6 de células mononucleares de sangre periférica de donadores sanos posterior a 24 hrs de estimulación con PMA.** Se muestran histogramas representativos de perfil de CCR6 de células estimuladas con 10 nM de PMA por 24 hrs, en comparación con perfil de autofluorescencia (células sin anticuerpo). Para estos ensayos se emplearon diluciones de anti-CCR6 de 1:20.

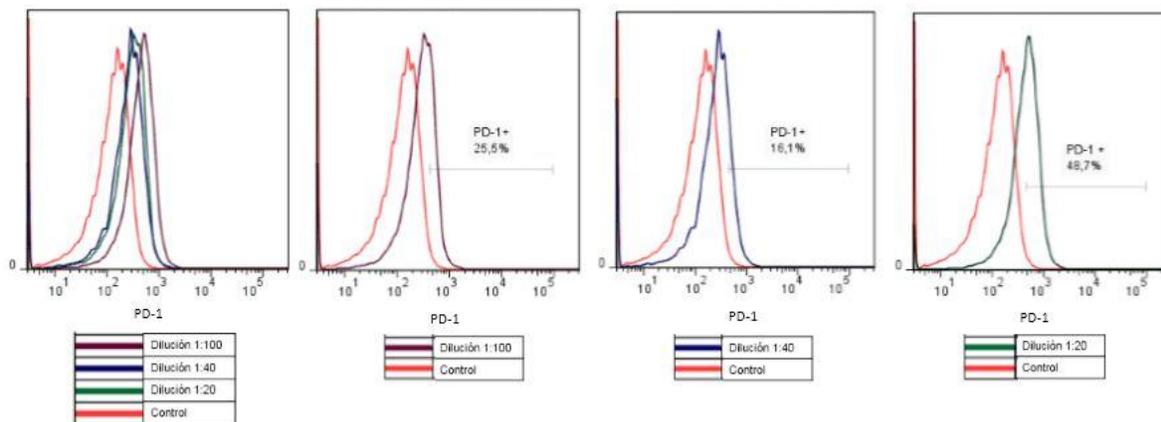
En la Figuras 9 se observa que el tratamiento con PMA durante 24 hrs ocasionó el incremento tanto en el porcentaje de células como en la intensidad media de fluorescencia (IMF) para PD-1 en las células CMSP de donadores. En base a estos resultados se consideró

como el estándar de referencia para proceder a la titulación del anticuerpo anti-PD-1. Por su parte, la estimulación de las células CMSP de donadores no indujo cambio apreciable en el perfil para CCR6 (Figura 10), por lo que parece no fuera necesario la estimulación de las células para su empleo. Sin embargo, dado que la estimulación se requerirá realizarla para la titulación del anticuerpo PD-1, decidimos emplear esta misma condición para realizar la titulación en paralelo tanto del anticuerpo anti-PD-1 como del anticuerpo anti-CCR6.

## **8.7. Titulación individual de anticuerpos para los marcadores PD-1, CCR6 y CD45.**

### **8.7.1. Titulación anticuerpo para PD-1.**

Para la evaluación de los niveles de células PD-1 en CMSP se empleó el anticuerpo anti-PD-1 acoplado con PE (clona EH12.2H7), con una concentración de proteína de 200 µg/ml. Para los ensayos de titulación de los anticuerpos se utilizaron  $1 \times 10^6$  células previamente estimuladas con PMA y fijadas con paraformaldehído (ver sección anterior). Después de sacarlas del refrigerador, las células se bloquearon con solución de PBS conteniendo 10% de suero humano durante 30 minutos en hielo. A continuación, las células se lavaron con una PBS pH 7.4, previo a transferirlas a los diferentes tubos de ensayo. Para el ensayo se emplearon 3 diferentes diluciones del anticuerpo: 1:20, 1:40, 1:100 (se descartaron las diluciones 1:200, 1:500, 1:1,000 debido a que en el primer bloque de diluciones se observó que la señal se perdía completamente después de la dilución 1:100), todo en un volumen final de 50 µl de solución de bloqueo. Todas las muestras, con diferentes diluciones, fueron incubadas en paralelo, en hielo por 30 min y protegidas de la luz. Posteriormente, fueron lavadas 2x con PBS en microfuga y, posterior a los lavados, las células fueron resuspendidas en solución de fijación (200 µl de PFA al 1%) y almacenadas a 4°C hasta su adquisición por el citómetro de flujo.



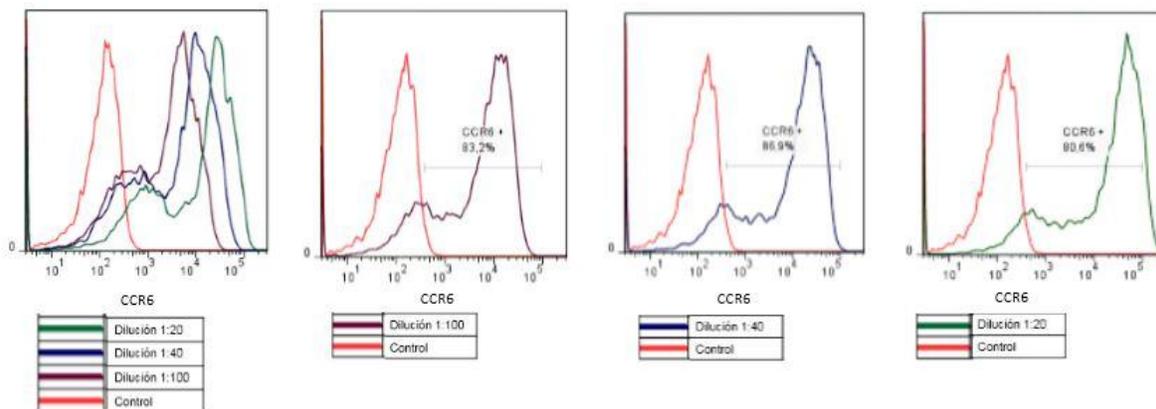
**Figura 11. Titulación de anticuerpo anti-PD-1.** Se observan el perfil de fluorescencia para las diluciones 1:20, 1:40 y 1:100 (derecha a izquierda) del anticuerpo comercial anti-PD-1, como se describe en el texto), así como el histograma conjunto (extremo izquierdo) para observar las diferencias.

De acuerdo a la Figura 11, se eligió utilizar la dilución 1:20 del anticuerpo secundario ya que fue la condición que mostró el máximo de señal y no pudo ser alcanzado por las otras diluciones.

### 8.7.2. Titulación anticuerpo para CCR6

Para la evaluación de los niveles de células CCR6 en CMSP se empleó el anticuerpo anti-CCR6 acoplado con PerCP-Cy5.5 (clona G034E3), con una concentración de proteína de 200 µg/ml.

Para estos ensayos se utilizaron  $1 \times 10^6$  células previamente estimuladas con PMA y fijadas con paraformaldehído (ver sección anterior). Después de sacarlas del refrigerador, las células se bloquearon con solución de PBS conteniendo 10% de suero humano durante 30 minutos en hielo. A continuación, las células se lavaron con una PBS pH 7.4, previo a transferirlas a los diferentes tubos de ensayo. Para el ensayo se emplearon 6 diferentes diluciones del anticuerpo: 1:20, 1:40, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1,000, en un volumen final de 50 µl de solución de bloqueo. Para las diluciones de 1:100-1:1000, se diluyeron previamente los anticuerpos en solución de bloqueo, antes de mezclarlas con las células. Todas las muestras, con diferentes diluciones, fueron incubadas en paralelo, en hielo por 30 min y protegidas de la luz. Posteriormente, fueron lavadas 2x con PBS en microfuga. Posterior a los lavados, las células fueron resuspendidas en solución de fijación (200 µl de PFA al 1%) y almacenada a 4°C hasta su adquisición por el citómetro de flujo.



**Figura 12. Titulación de anticuerpo anti-CCR6.** Se observan el perfil de fluorescencia para las diluciones 1:20, 1:40 y 1:100 (derecha a izquierda) del anticuerpo comercial anti-CCR6, como se describe en el texto), así como el histograma conjunto (extremo izquierda) para observar las diferencias. La figura no muestra las diluciones 1:200, 1:500 y 1:1000, porque no se diferenciaron de la dilución 1:100.

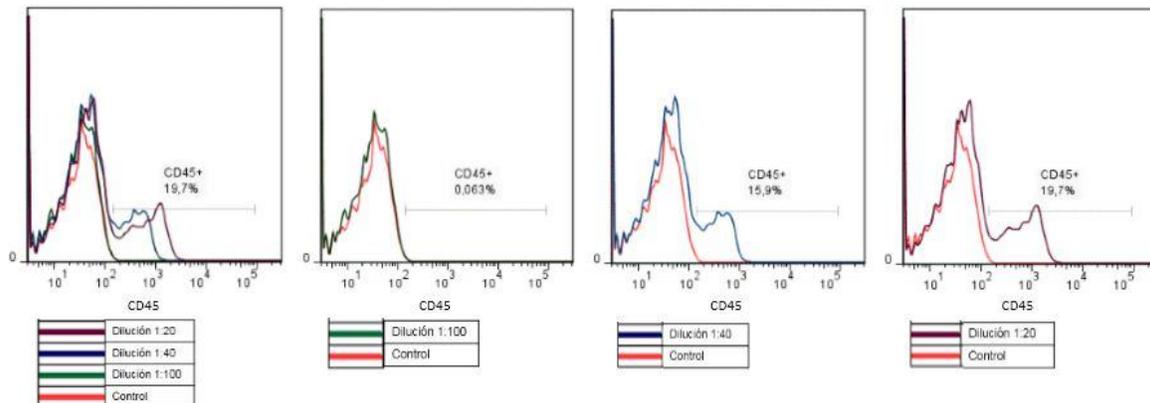
De acuerdo a la Figura 12, se eligió utilizar la dilución 1:100 del anticuerpo secundario ya que fue la condición donde se empleó menos anticuerpo obteniendo una señal claramente diferente al perfil de autofluorescencia; a pesar de que los perfiles con menores diluciones mostraron una pérdida en la intensidad de fluorescencia.

### 8.7.3. Titulación anticuerpo para CD45

Para la evaluación de los niveles de células CD45 en CMSP se empleó el anticuerpo anti-CD45 acoplado con APC (clona UCHL1), con una concentración de proteína de 200  $\mu\text{g/ml}$ .

Para estos ensayos se utilizaron  $1 \times 10^6$  células previamente estimuladas con PMA y fijadas con paraformaldehído (ver sección anterior). Después de sacarlas del refrigerador, las células se bloquearon con solución de PBS conteniendo 10% de suero humano durante 30 minutos en hielo. A continuación, las células se lavaron con una PBS pH 7.4, previo a transferirlas a los diferentes tubos de ensayo. Para el ensayo se emplearon 3 diferentes diluciones del anticuerpo: 1:20, 1:40, 1:100 (se descartaron las diluciones 1:200, 1:500, 1:1,000 debido a que en el primer bloque de diluciones se observó que la señal se perdía completamente después de la dilución 1:100), en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$  de solución de bloqueo. Todas las muestras, con diferentes diluciones, fueron incubadas en paralelo, en hielo

por 30 min y protegidas de la luz. Posteriormente, fueron lavadas con PBS 2x en microfuga. Posterior a los lavados, las células fueron resuspendidas en solución de fijación (200 ml de PFA al 1%) y almacenada a 4°C hasta su adquisición por el citómetro de flujo.

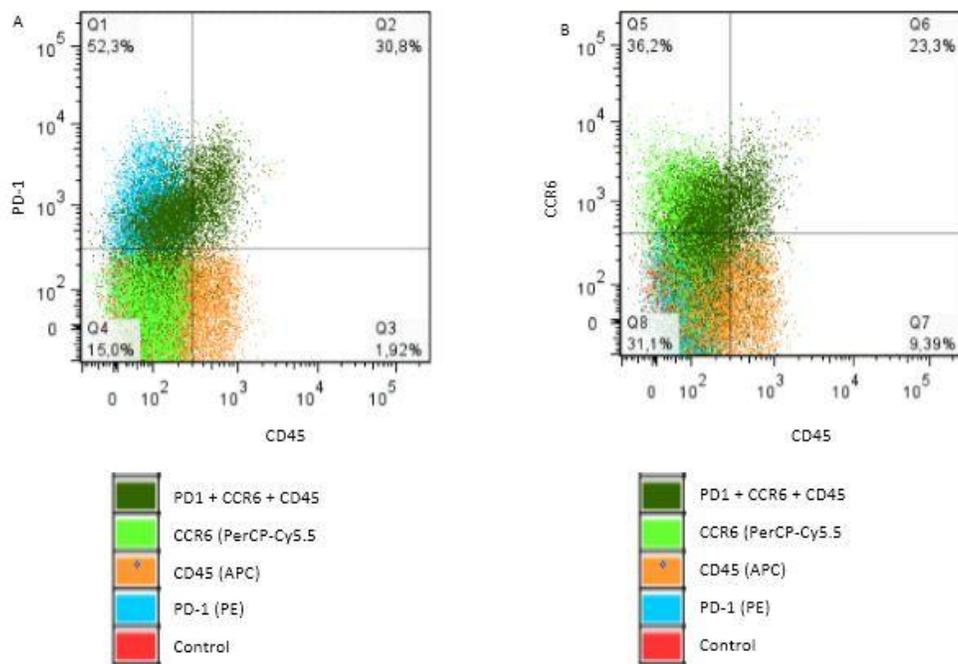


**Figura 13. Titulación de anticuerpo anti-CD45.** Se observan el perfil de fluorescencia para las diluciones 1:20, 1:40 y 1:100 (derecha a izquierda) del anticuerpo comercial anti-CCR6, como se describe en el texto), así como el histograma conjunto (extremo izquierda) para observar las diferencias.

De acuerdo con la Figura 13, se eligió utilizar la dilución 1:20 del anticuerpo ya que fue la menor dilución donde se obtuvo el máximo de fluorescencia.

#### 8.8. Compensación: Estandarización del panel multicolor (PD-1-/ CCR6/ CD45).

Una vez seleccionadas las concentraciones de los anticuerpos comerciales dirigidos contra los marcadores celulares, se procedió a elaborar el montaje del panel con la intención de evaluar posibles interferencias entre los fluorocromos usados. Para ello,  $1 \times 10^6$  de células mononucleares de sangre periférica fueron bloqueadas con PBS + 10% de suero humano durante 30 minutos en hielo, se lavaron con una solución de fosfato alcalino (PBS pH 7.4) y se centrifugaron a 1,750 rpm durante 7 minutos. Posteriormente, fueron incubadas con las concentraciones de los anticuerpos previamente seleccionadas y se volvieron a lavar con PBS y fueron fijadas con PFA 2% y se guardaron hasta su paso por el citómetro.



**Figura 14. Estandarización del panel multicolor.** La imagen está compuesta por los perfiles de fluorescencia individuales para PD-1 (azul), CD45 (naranja), CCR6 (verde limón), el conjunto de puntos color verde bandera corresponde a la tinción triple PD-1/CCR6/CD45.

### 8.9. Determinación de los porcentajes celulares y abundancia relativa de receptores PD1 y CCR6.

Para la evaluación de muestras clínicas se emplearon  $5 \times 10^5$  células de cada paciente y  $1 \times 10^6$  células de cada donador sano, estas últimas fungieron como control de tinción para establecer las características de la población en cada análisis. En cada evaluación se usaron como controles las siguientes tinciones:

1. CMSP no teñidas.
2. CMSP teñidas con CD45
3. CMSP teñidas con PD-1
4. CMSP teñidas con CCR6

Mientras que cada una de las muestras de pacientes fueron bloqueadas con FACS Juice al 10% de suero humano y teñidas conjuntamente con una mezcla de los anticuerpos anti-CD45, anti-PD-1 y anti-CCR6 usando cada una de las concentraciones antes establecidas para cada anticuerpo (secciones 8.7.1, 8.7.2 y 8.7.3). Una vez terminada la tinción, fueron fijadas con PFA al 2% y guardadas a  $4^\circ\text{C}$  hasta su adquisición en el citómetro.

Para cada muestra clínica se procedió al siguiente protocolo de análisis: 1) se determinó el perfil bidimensional de FCS (forward scatter) vs SSC (side scatter). En base a este perfil se seleccionó sólo la población de linfocitos, descartando los eritrocitos/detrítus, así como las células polimorfonucleares. 2) Se procedió a descartar los dobles y tripletes que pudieran llegar a formarse. 3) Posteriormente, se procedió a analizar la población seleccionada en cada uno de los canales en los que cada uno de los fluoróforos emiten su señal en diferentes dot blot

- PE (PD-1) vs PerCP-Cy5.5 (CCR6)

- PE vs APC

- PerCP-Cy5.5 vs PE

- PerCP-Cy5.5 vs APC

Para determinar tanto el porcentaje de células positivas para cada una de las subpoblaciones de estudio. 4) También se realizaron gráficas de histograma para cada una de las subpoblaciones en estudio para observar el número de eventos que emitían esa señal.

#### **8.10. Evaluaciones séricas de pacientes.**

Los niveles de FR, VSG y proteína C reactiva se realizaron por la técnica de turbidimetría en la Clínica Esquipulas (pacientes indígenas) y Hospital General de Cuernavaca (pacientes urbanos).

#### **8.12. Análisis estadístico**

Se empleó estadística descriptiva (medias y desviación estadística) para todas las variables clínicas. Se empleó la prueba de t de Student (Mann-Whitney y Wilcoxon pruebas no paramétricas) para comparar entre grupos de pacientes y análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias entre grupos. Los datos de tiempo se analizaron por el método de Kaplan-Meier. Para el análisis de los resultados de citometría de flujo se empleó el programa Prism v.8.4.2. A. para adquisición de los datos y el programa FlowJo v.7.6 para su análisis y representación gráfica.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Características clínicas de grupos de pacientes.

En la Tabla VI se resumen las características demográficas y clínicas de los pacientes con AR indígenas y urbanos reclutados. Se recolectaron 59 muestras de pacientes que asisten a la consulta en el Hospital General de Cuernavaca y 28 muestras de pacientes indígenas que asistieron a la clínica Esquipulas, sin embargo, por razones técnicas sólo se analizaron 25 pacientes urbanos y 20 pacientes indígenas de acuerdo a las condiciones referidas en la sección de Metodología.

La edad promedio de los pacientes urbanos fue de  $50.29 \pm 11.2$  años y en el caso de los pacientes indígenas fue de  $47.15 \pm 11.02$  años, no observando diferencia significativa (Tabla VI). De manera similar, ambos grupos de pacientes también presentaron un IMC estadísticamente similar. Por su parte, el tiempo promedio de tiempo desde el inicio de los síntomas fue de  $11.91 \pm 8.39$  años para el caso de los pacientes urbanos y de  $7.0 \pm 3.35$  años para el caso de los pacientes indígenas, por lo que, de acuerdo a los criterios establecidos por el Colegio Americano de Reumatología, son diagnosticados con AR establecida. Sin embargo, al momento de comparar entre los dos grupos de pacientes pudimos observar una diferencia significativa, teniendo menos tiempo con la enfermedad el grupo de pacientes indígenas. Todos los pacientes cuentan con evaluaciones serológicas, en el caso de los pacientes urbanos, las determinaciones de FR fueron hechas por el método de nefelometría, la VSG se determinó por el método de Westergreen y la PCR por turbidimetría. En el caso de los pacientes indígenas, la determinación de FR fue por el método de ELISA y la determinación de PCR fue por inmunofrecuencia a punto final, finalmente, la VSG también se realizó por el método de Westergreen.

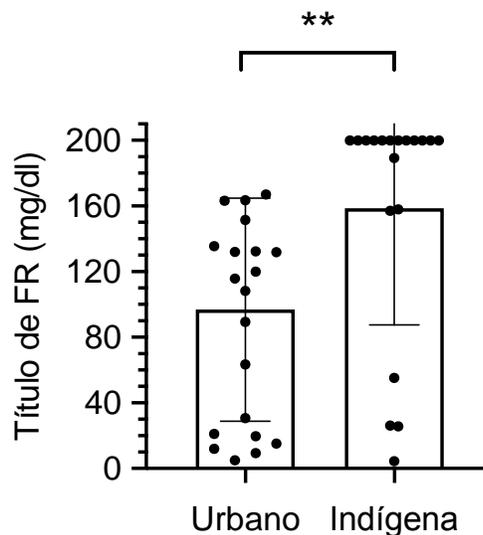
Tabla VI. Características generales de pacientes y donadores.

	Urbanos	Indígenas	<i>p</i> *
<b>Edad</b> , años promedio(DE)	50.29 (11.2)	47.15 (11.02)	0.328
<b>IMC</b> , kg/m <sup>2</sup> , promedio (DE)	26.5.03 (3.88)	25.5 (3.63)	0.556
<b>T. evol.</b> , años, promedio (DE)	11.91 (8.39)	7.0 (3.35)	<b>&lt;0.001</b>
<b>VSG</b> , mm/h, promedio(DE)	27.86 (10.02)	25.53 (17.39)	0.301
<b>PCR</b> , mg/dL, promedio(DE)	7.90 (8.26)	14.83 (38.26)	0.125
<b>FR</b> , mg/dL, promedio(DE)	96.78 (67.9)	158.7 (71.17)	<b>0.001</b>

<b>FR positivo, %.</b>	71.4	84.2	--
<b>aCCP, UI/dl, promedio (DE)</b>	93.7 (89.64)	106 (80.6)	0.977
<b>aCCP positivo, %</b>	53.3	81.3	
<b>AI, promedio (DE)</b>	3.09 (2.35)	4.33 (4.8)	0.799
<b>AD, promedio (DE)</b>	2.65 (3.7)	13.06 (9.5)	<b>0.000</b>
<b>DAS28, promedio(DE)</b>	3.68 (1.04)	4.31 (1.47)	0.231

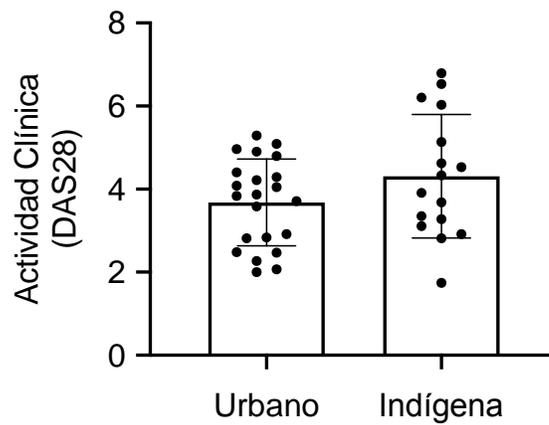
DE, desviación estándar; T. evol., tiempos desde el inicio de síntomas; VSG, velocidad de sedimentación globular; PCR, proteína C reactiva; FR, factor reumatoide; aCCP, antipéptido citrulinado cíclico; AI, articulaciones inflamadas; AD, articulaciones dolorosas; DAS28, índice de actividad clínica. \*Mann Whitney,  $p < 0.05$

En la Tabla VI podemos observar que al comparar entre pacientes urbanos e indígenas en base a los valores de VSG no se observaron diferencias significativas, aunque en los dos casos los niveles son característicos de una alteración inflamatoria. Para el caso de la PCR, el grupo de pacientes indígenas mostró un nivel promedio mayor, sin embargo esta diferencia no alcanzó significancia estadística ( $p=0.125$ ). Por su parte, al comparar los títulos del autoanticuerpo FR (Figura 15), se observó un nivel estadísticamente mayor en los pacientes indígenas 158.7 vs. 96.78,  $p < 0.002$ . Asimismo pudimos observar un mayor porcentaje de pacientes seropositivos para este marcador (84.2 vs. 71.4, indígenas vs. urbanos, respectivamente). En base al marcador aCCP, los títulos del autoanticuerpo fueron estadísticamente similares en ambos grupos, sin embargo, los pacientes indígenas parecen mostrar un porcentaje mayor de pacientes seropositivos.



**Figura 15. Comparación entre pacientes urbanos e indígenas con AR en base a título de FR.** En el caso de los pacientes indígenas y urbanos, la determinación de FR fue por el método de ELISA, mientras que las muestras de pacientes urbanos fueron evaluadas por nefelometría.

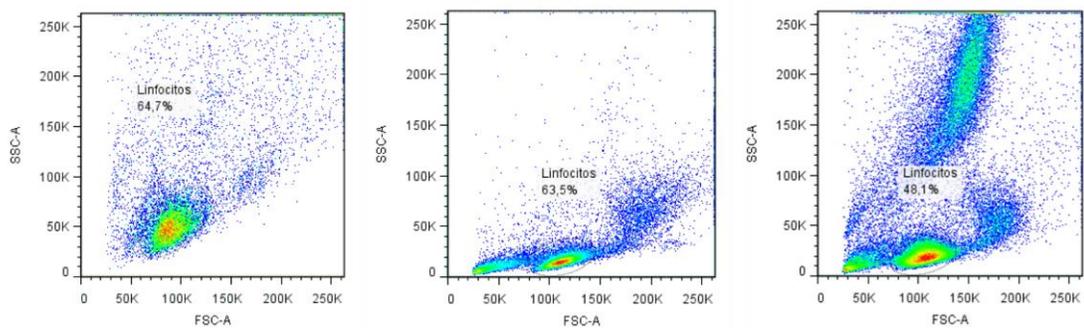




**Figura 17. Comparación de la actividad clínica de todos los pacientes urbanos e indígenas.** Para determinación del puntaje DA28 se consideraron las variables AI, AD, VSG y evaluación visual análoga (EVA) del médico y siguiendo el algoritmo internacionalmente aceptado.

### 9.2. Comparación de la frecuencia relativa de subpoblaciones celulares entre donadores y pacientes.

En la Figura 18 se observa una comparación representativa de las subpoblaciones celulares observadas en las muestras de donadores sanos (empleadas para la titulación de anticuerpos y calibración de condiciones de compensación), las muestras de sangre de pacientes urbanos con AR y las muestras de sangre de pacientes indígenas con AR. Es de resaltar que las preparaciones provenientes de Chiapas presentan una alta proporción de células con alta granularidad (SSC-A) y gran tamaño (FSC-A) y que característicamente se identifican como células polimorfonucleares. Esta subpoblación está ausente en las muestras provenientes de donadores o pacientes urbanos, debido a que fueron semipurificadas por la técnica de Ficoll Paque (metodología). Es por esto que los porcentajes relativos de la población de células de la subpoblación de linfocitos fue ligeramente mayor en estas últimas preparaciones (60-70% vs. 40-55%), con relación a las preparaciones de pacientes indígenas. Como se describió en la metodología, debido a las condiciones de procesamiento y transportación de las muestras celulares desde San Cristóbal de las Casas al laboratorio 13 de la Facultad de Farmacia (Cuernavaca).



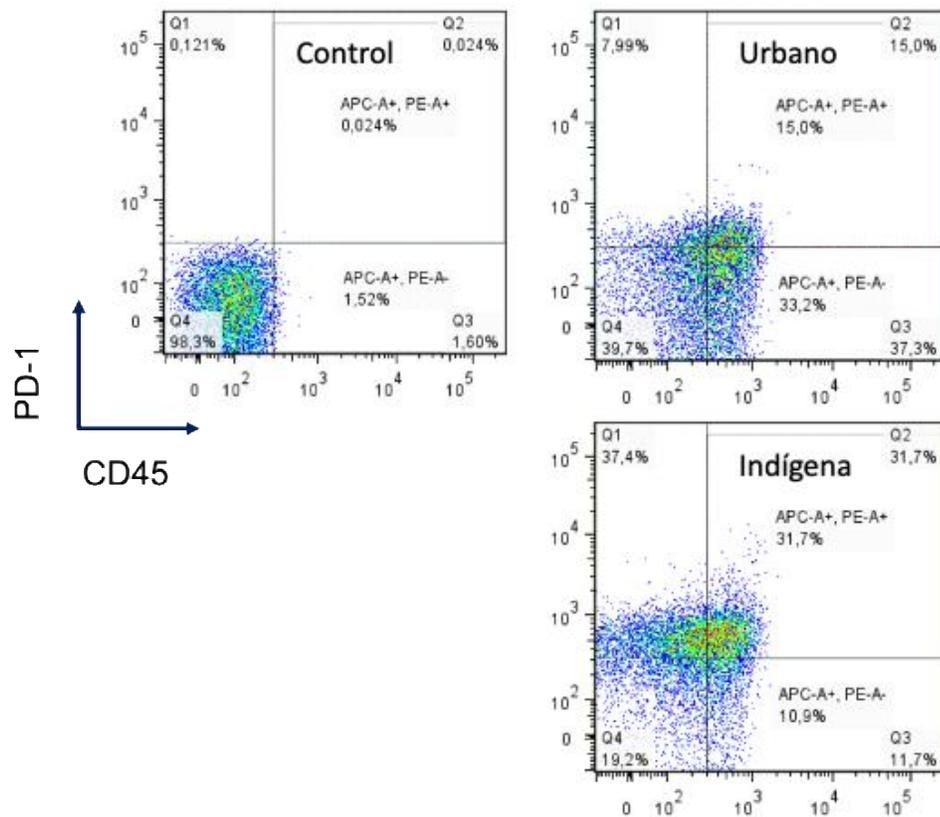
**Figura 18. Comparación de la distribución de subpoblaciones celulares en las preparaciones de donadores control y pacientes urbanos e indígenas con AR.** Las preparaciones celulares derivadas de sangre periférica de donadores control (izquierda) y pacientes urbanos con AR (centro) fueron procesadas por la técnica de Ficoll Paque. Mientras que la preparación celular derivada de sangre periférica de pacientes indígenas con AR (derecha) fueron procesadas por lisis de eritrocitos. Se muestra el porcentaje de la subpoblación linfocítica.

### 9.3. Comparación de la frecuencia relativa de poblaciones celulares PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>, PD-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>, CCR6<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, CCR6<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> y CCR6<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup> entre pacientes de Morelos e indígenas.

En la Figura 19 se observa la frecuencia relativa (%) de las subpoblaciones celulares PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> y PD-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>, entre ambos grupos de pacientes. Inicialmente se observa las condiciones control de autofluorescencia que sirvió como referencia de los límites de positividad tanto para el marcador PD-1 como CD45 (arriba izquierda).

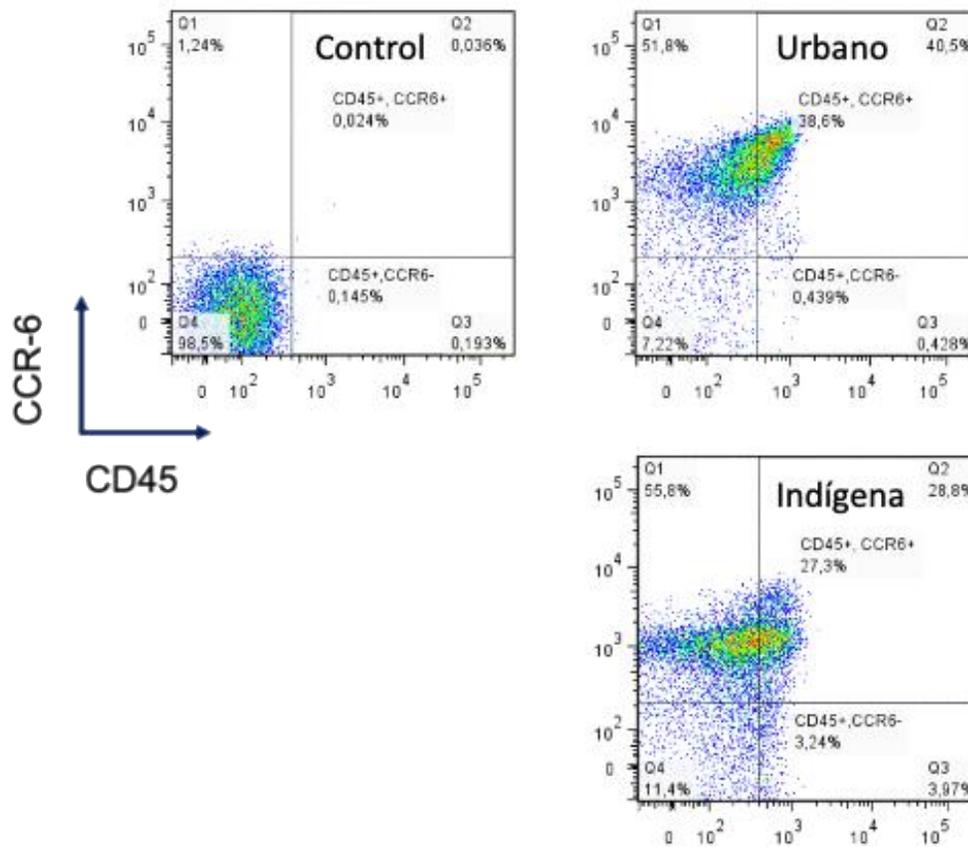
Al comparar los perfiles de distribución de las subpoblaciones celulares se observa que aparentemente las células sanguíneas de los pacientes indígenas tienen mayor nivel de células PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> y PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> que los pacientes urbanos. Consecuentemente, los pacientes urbanos parecen mostrar un porcentaje mayor de células PD-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>.

Por el otro lado, en la Figura 20 se observa la frecuencia relativa (%) de las subpoblaciones celulares CCR6<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, CCR6<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> y CCR6<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>, entre ambos grupos de pacientes. Inicialmente se observa las condiciones control de autofluorescencia que sirvió como referencia de los límites de positividad tanto para el marcador PD-1 como CD45 (arriba izquierda).



**Figura 19. Comparación representativa de las subpoblaciones PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> y PD-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup> en ambos grupos de pacientes.** Control (arriba-izquierda), correspondiente a la autofluorescencia de células control que permitió establecer los límites negativos. Se observan distribución de células en una preparación de pacientes urbanos (arriba-derecha) y una preparación de pacientes indígenas (abajo-derecha).

Al comparar las subpoblaciones celulares entre ambos grupos de pacientes, a diferencia de lo que se observó para el marcador PD-1, parece que no se observaron diferencias muy marcadas en términos del porcentaje celular. Quizás el cambio más claro pueda ser el aumento en los niveles de fluorescencia de las células marcadas para CCR6 (IMF), en comparación con las células de los pacientes indígenas.



**Figura 20.** Comparación representativa de las subpoblaciones CCR6<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, CCR6<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> y CCR6<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup> en ambos grupos de pacientes. Control (arriba-izquierda), correspondiente a la autofluorescencia de células control que permitió establecer límites negativos. Se observan distribución de células en una preparación de pacientes urbanos (arriba-derecha) y una preparación de pacientes indígenas (abajo-derecha).

#### 9.4. Comparación total de la abundancia relativa las subpoblaciones celulares y el nivel de presencia relativo por célula de los marcadores celulares entre pacientes de Morelos e indígenas.

En la Tabla VII se observan los resultados promedio y desviación estándar de la abundancia relativa de las subpoblaciones evaluadas en las muestras de pacientes urbanos e indígenas. Asimismo, en la parte baja de la Tabla, se muestran los resultados promedio de la abundancia relativa por célula (Intensidad Media de Fluorescencia) para cada uno de los marcadores celulares (PD-1, CCR6 y CD45).

En congruencia con la abundancia relativa comparativa de las subpoblaciones celulares entre ambos grupos de pacientes, se observó que el porcentaje de las células PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> y PD-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup> fue estadísticamente mayor en los pacientes indígenas, en comparación con los pacientes urbanos. Como se evidencia en la Figura 19, la

diferencia más clara es con referencia a las poblaciones celulares positivas para PD-1, permitiendo obtener un  $p < 0.001$ . Mientras que la población PD-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup> es mayor en los pacientes indígenas, pero con una  $p < 0.04$ .

Por su parte, la abundancia relativa comparativa de las poblaciones celulares CCR6<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> y CCR6<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> fue estadísticamente similar entre ambos grupos de pacientes. Pero en particular la población CCR6<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup> parece ser superior para el caso de los pacientes indígenas. Sin embargo, como se observa en la Tabla, el porcentaje presente es minoritario (<2%) por lo que nos permitiría dudar si no se trata de un error metodológico o es un fenómeno real. En cualquier caso, debido a que el porcentaje celular es mucho menor que las otras poblaciones celulares, su influencia biológica sería muy limitada (ver Discusión).

Tabla VII. Comparación del promedio de la abundancia relativa de las subpoblaciones celulares a evaluar, así como de la abundancia relativa por célula (IMF) para cada marcador celular.

<b>Variable</b>	<b>Urbanos</b>	<b>Indígenas</b>	<b>p*</b>
PD1 <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> , promedio (DE)	5.38 (8.63)	29.79 (13.57)	<b>0.000</b>
PD1 <sup>+</sup> /CD45 <sup>-</sup> , promedio (DE)	1.65 (3.14)	18.44 (15.72)	<b>0.000</b>
PD1 <sup>-</sup> /CD45 <sup>+</sup> , promedio (DE)	40.49 (22.56)	26.72 (21.48)	<b>0.035</b>
CCR6 <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> , promedio (DE)	43.04 (23.81)	52.32 (29.87)	0.313
CCR6 <sup>+</sup> /CD45 <sup>-</sup> , promedio (DE)	35.33 (17.84)	35.38 (23.74)	0.986
CCR6 <sup>-</sup> /CD45 <sup>+</sup> , promedio (DE)	0.81 (2.16)	1.68 (1.36)	<b>0.000</b>
PD-1 IMF, promedio (DE)	141.0 (47.33)	332.4 (75.6)	<b>0.000</b>
CCR6 IMF, promedio (DE)	1403 (1023)	1071 (443.9)	0.865
CD45 IMF, promedio (DE)	333.4 (163.5)	315.9 (114.0)	0.910

IMF, Intensidad media de fluorescencia; p, significancia estadística <0.05 (prueba de Mann Whitney).

Al comparar la abundancia relativa de los marcadores celulares por célula (IMF), como era de esperarse, el nivel de PD-1 parece duplicar en las células linfocíticas de los pacientes indígenas, en comparación de las células de pacientes urbanos. Incluso si consideramos que hay una variación experimental importante, esta no es suficiente para hacer comparables los niveles entre ambos grupos de pacientes, por lo que parece ser una de las grandes diferencias celulares observadas entre los dos tipos de pacientes. Por su parte, al comparar los niveles relativos de CCR6 o CD45 entre los grupos de pacientes, observamos

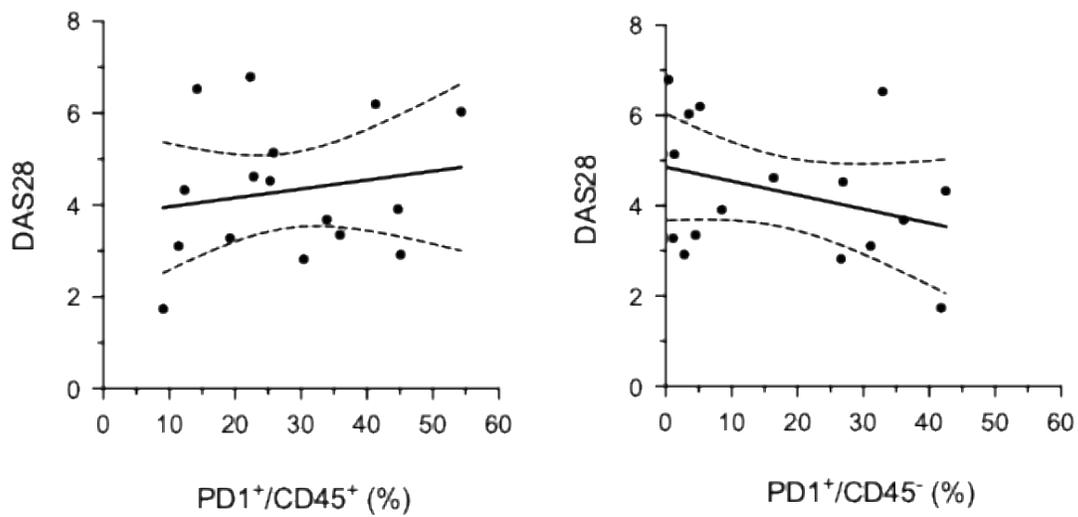
que fueron estadísticamente similares. Quizás una de las causas que no se pudo evidenciar diferencias entre grupos fue debido a la gran variación experimental observada, siendo demasiado alta para el marcador CCR6 de los pacientes urbanos. Ciertamente la única manera de poder modificar este resultado sería aumentar el número de pacientes reclutados y estudiados.

#### **9.5. Relación entre la frecuencia relativa de subpoblaciones celulares células PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>, PD-1<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup>, CCR6<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, CCR6<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> y CCR6<sup>-</sup>/CD45<sup>+</sup> y actividad clínica de pacientes indígenas con AR.**

En la Figura 21 se observan los análisis de correlación entre la actividad clínica (DAS28) y los porcentajes de poblaciones celulares PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> en los pacientes indígenas. Para la población celular PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> (Figura 21A) se puede observar que ligeramente se incrementa al aumentar el DAS28, lo cual refleja un valor bajo de Rho (=0.123). Sin embargo, también se observa que gran variación entre los eventos resultando en una ausencia de significancia estadística (p=0.648).

Por su parte en la Figura 21B se puede observar que el porcentaje de la población PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> disminuye conforme se incrementa el DAS28 (Rho= 0.265). Sin embargo, también se observa que variación entre los eventos da como resultado que no se alcance la significancia estadística (p=0.321).

Aunque se evaluaron por las pruebas de correlación para las otras variables de poblaciones celulares y abundancia relativa por célula de los marcadores, solamente los anteriores dieron diferencias. Incluso se juntaron los niveles relativos de PD-1 de ambos grupos de pacientes y aunque se observó un ligero incremento del marcador PD-1 conforme aumenta el índice de actividad, tampoco fue estadísticamente significativo. De esa manera, en base a estos resultados se puede concluir que los cambios en los niveles de las poblaciones celulares o de los marcadores celulares parecen no relacionarse con la actividad clínica de los pacientes.



**Figura 21. Análisis de correlación entre el índice de actividad clínica (DAS28) y el porcentaje relativo de las poblaciones PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>, PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> en el grupo de pacientes indígenas.** A. Análisis de correlación de población PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> (Rho= 0.123, p=0.648). B. Análisis de correlación de población PD-1<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> (Rho= 0.265, p=0.321). Para el análisis se empleó la prueba de Spearman (prueba no paramétrica) y el software Prism v.8.4.2. A.

## 10. DISCUSION

### 10.1. Comparación y diferencias clínicas entre pacientes urbanos e indígenas

Como se describió en la Justificación, nuestro interés para realizar el presente estudio fue, en primer nivel, generar información original sobre las características celulares en pacientes con AR indígenas, en comparación con pacientes urbanos. Aunque se podría relacionar estos últimos pacientes con el término "mestizo mexicano", no se incluyeron antecedentes de ancestría o marcadores genéticos que permitieran confirmar que se trata de este grupo poblacional. Sin embargo, como otros estudios han mostrado [119], genéticamente los mestizos mexicanos de por sí es un grupo altamente heterogéneo, por lo que es difícil considerarlo como referencia. En ese sentido, el reclutar pacientes de comunidades indígenas de los Altos de Chiapas (tzotziles, tzeltales y chol, fundamentalmente el 90%), podría ser considerado un grupo genético un poco más homogéneo; aunque hasta la fecha no encontramos ningún estudio genético de estas étnias. Por el otro lado, como varios estudios previos han sugerido, la AR es una patología altamente heterogénea dado que intervienen elementos genéticos, ambientales y farmacológicos, todo lo cual puede alterar tanto la historia de la enfermedad, así como los factores celulares que subyacen a esta [120-123]. Sin embargo, resulta siempre importante la búsqueda de biomarcadores de la enfermedad para orientar al reumatólogo sobre la evolución de la enfermedad, la eficacia del tratamiento farmacológico o los posibles efectos adversos. En base a lo anterior y con apoyo de los dos centros hospitalarios con clínicas para la atención de pacientes con AR, es que pudimos emprender el presente proyecto.

Como se describió previamente, aunque se pudo reclutar un número mayor de pacientes, debido a factores técnicos sólo pudimos evaluar de manera completa a 25 y 20 pacientes urbanos e indígenas, respectivamente. Por lo que los resultados pudieran modificarse al incrementarse el número de muestras de pacientes analizadas. En todo caso, al comparar el grupo de pacientes urbanos e indígenas estudiados pudimos observar diferencias en el tiempo (años) que tiene síntomas, títulos de FR, seropositividad para aCCP y el número de articulaciones dolorosas. Para el caso del tiempo con síntomas (tiempo de evolución), los pacientes urbanos fue el grupo que tenía mayor tiempo con la enfermedad y, también, con tratamiento "modificador de la enfermedad". Condición que puede participar en los resultados celulares observados. Por su parte, los pacientes indígenas mostraron títulos mayores para FR, mayor seropositividad para aCCP y mayor número de articulaciones

dolorosas. A reserva del marcador FR, que parece no tener una asociación con la actividad clínica, las otras dos variables se han relacionado con mayor actividad clínica de la enfermedad. En este sentido, muy recientemente, en un estudio comparativo se confirma que la seropositividad para aCCP se asocia con mayor actividad clínica de los pacientes [124]. Por su parte, como se describió, el número de articulaciones dolorosas es uno de los factores que se toman en cuenta para calcular el índice DAS28, por lo cual resulta un poco sorprendente que a pesar de que los pacientes indígenas mostraron mayores síntomas de dolor, eso no impactó suficientemente para mostrar una diferencia en el DAS28. Sin embargo, al observar la Figura 17 se puede observar que un subgrupo de paciente indígenas presentaron índices altos de actividad, situación que no se presentó con los pacientes urbanos. Eso nos recuerda que una importante limitación del presente estudio es el bajo número de pacientes por grupo así como también que, a pesar de que se sigue la misma guía en las evaluaciones reumatológicas son diferentes especialistas.

De esa manera, en términos generales, a pesar de las diferencias arriba mencionadas, los pacientes mostraron un promedio de actividad clínica similar, así como el mismo esquema de tratamiento "modificador de la enfermedad" (tratamiento combinado en base de metotrexato + sulfazalacina o hidroxicloroquina y el 60-70% recibió prednisona).

## **10.2. Comparación y diferencias fenotípicas en células sanguíneas entre pacientes urbanos e indígenas.**

En base a los antecedentes de la literatura especializada, que se resumen en las tablas III y IV, los marcadores PD-1 y CCR6 parecen incrementarse en células de pacientes con AR, tanto en células periféricas, en sinoviales, o en ambas. Asimismo parece que este fenotipo es muy característico porque se puede reproducir en modelos murinos, donde su neutralización específica (mediante anticuerpos) impacta claramente sobre el desarrollo de la artritis. Es por eso que se eligieron en este estudio para ser evaluados como criterios de variación entre poblaciones mexicanas con el mismo tipo de enfermedad. Como se discutió en la sección previa, en base a los criterios con lo que se cuenta y con un limitado número de pacientes evaluados, parecería que ambos grupos son similares en términos clínicos y, por lo tanto, uno esperaría encontrar variaciones de esto marcadores asociadas al nivel de actividad clínica. Sin embargo, los resultados sugieren que factores aún sin identificar, pueden relacionar los niveles de PD-1 no con la actividad clínica, pero sí al grupo étnico. Por su

parte, los niveles de CCR6 en células linfocíticas de sangre periférica parecen no tener relación ni con la actividad clínica ni con el grupo étnico.

En base a los antecedentes descritos en la Introducción, la proteína PD-1 parece funcionar como un receptor de inhibición de la respuesta de activación del TCR, en linfocitos T, por lo cual se ha asociado y confirmado funcionalmente con la evasión de la respuesta inmune por parte de células tumorales [60]. Por su parte, en el contexto autoinmune, se ha sugerido que la alteración de sus niveles podrían favorecer cambios en el mecanismo de tolerancia inmunológica, en particular en pacientes con lupus eritematoso sistémico[58]. Sin embargo, para el caso particular de AR no es tan claro su posible participación [62]. Por un lado, se sugiere que la expresión de PD-1 podría, en caso de interaccionar con su ligando PDL-1 en la superficie de otra célula, inhibir la fosforilación en las Tyr en los dominios ITAM del complejo TCR y, por lo tanto, bloquear la activación o llevar a la anergia celular [125]. En base a los resultados del presente estudio, donde observamos que las células linfocíticas de los pacientes indígenas presentan niveles más elevados de PD-1, supondría que de tener interacción con células que expresen PDL-1 deberían ocasionar la inhibición de la respuesta de activación de los linfocitos T y, potencialmente, la disminución de la respuesta inflamatoria local y sistemática. En ese sentido, sería de gran interés es poder evaluar los niveles de células PDL-1 en circulación o a nivel sinovial. Por el otro lado, la inducción farmacológica de la expresión de PDL-1 podría servir como alternativa terapéutica para este caso concreto. En el caso de los pacientes urbanos, la situación no parece favorecedora dado que al presentar niveles bajos de PD-1, la inducción de la expresión de PDL-1 o su interacción con células PDL-1<sup>+</sup> potencialmente induciría un efecto parcial sobre la inhibición de la respuesta inflamatoria. En cierta manera, podría sugerirse en este preciso contexto que las células linfocíticas serían parcialmente refractarias a la inhibición del TCR.

Con el fin de identificar los factores de expresión, inicialmente habría que evaluar los niveles PD-1 en células linfocíticas de donadores indígenas sanos o sin autoinmunidad, porque potencialmente podría tratarse de elementos asociados genéticamente con la ancestría y que en caso de los pacientes urbanos ese genotipo se ha perdido. Posteriormente, habría que realizar un estudio epidemiológico amplio para evaluar cuales son las condiciones personales o ambientales que favorecen un alto nivel de expresión de PD-1 en linfocitos.

En el caso particular del receptor CCR6, como se mencionó arriba, también varios estudios señalaron su asociación con la infiltración sinovial y la actividad clínica. En el primer caso, se había sugerido que los niveles de células CCR6<sup>+</sup> se incrementaban a nivel sinovial y disminuían a nivel periférico [74, 81, 126]. Sin embargo, en nuestro estudio, no

observamos si un incremento o disminución asociada con la actividad clínica de paciente. Si bien es cierto que en la estandarización de CCR6 no se observan diferencias entre las células estimuladas de las no estimuladas durante la tinción con el anticuerpo, si se observan dos poblaciones para el caso de las células no estimuladas, el cual tiende a desaparecer cuando las células son estimuladas con PMA volviéndose una población más homogénea, esto podría deberse a que la población de linfocitos presenta una sobre expresión de la molécula CCR6 y no nos permitió en este caso poder observar las pequeñas diferencias entre la expresión de CCR6 en linfocitos T y B. Asimismo, tampoco observamos diferencias estadísticas entre ambos grupos de pacientes, suponiendo que su expresión tiene menos relación con elementos genéticos que el receptor PD-1. Sin embargo, como se había descrito previamente, la presencia de linfocitos CCR6 positivos en circulación supondría un estado previo a la infiltración tisular, puesto que sólo se requeriría la presencia de un gradiente del ligando CCL20. Como se describió en la Metodología, las células mononucleares de sangre periféricas de donadores sanos mostraron niveles muy bajos de PD-1, pero no así para CCR6, pudiendo suponer que los niveles de CCR6 en linfocitos de sangre periférica no se alteran de manera significativa en los pacientes con AR.

### **10.3. Limitaciones del estudio**

Quizás la principal limitante del estudio fue la cantidad de muestras analizadas, situación que dependió de factores ajenos a nuestra voluntad, que van desde la visitas de los pacientes indígenas, hasta su transportación a tiempo, la cantidad suficiente de reactivos (anticuerpos para fenotipificación de las células) y la disponibilidad del tiempo para el empleo de citómetro de flujo. En ese sentido, el bajo número de muestras analizadas no sólo limitó la potencia estadística, sino impidió que pudieramos hacer sub-análisis de los pacientes.

Por otro lado, también hay que considerar que inicialmente se había considerado realizar este análisis en conjunto con los marcadores CD3, CD4 y CD8, para poder identificar las subpoblaciones de linfocitos T con alteraciones en los niveles de los marcadores celulares. Sin embargo, en las últimas etapas de la estandarización nuestros lotes de anticuerpos monoclonales derivados de hibridomas mostraron pobre desempeño, posiblemente por error en el almacenamiento. Es por eso que en estas circunstancias, optamos por sólo referenciar los niveles de PD-1 o CCR6 en base a los niveles de CD45.

Tampoco se consideró una comparación entre los grupos de pacientes respecto al esquema de tratamiento que siguen ambas poblaciones de estudio.

## 11. CONCLUSIONES

1. Las poblaciones celulares de linfocitos PD-1+/CD45+, PD-1+/CD45- fueron significativamente mayores en los pacientes indígenas, en comparación a los pacientes urbanos.
2. Los niveles relativos de PD-1 en la superficie celular parece ser superior en los pacientes indígenas, en comparación con los pacientes urbanos.
3. Ni las poblaciones celulares de linfocitos CCR6/CD45, ni los niveles relativos de CCR6 en la superficie celular fue diferente en las muestras de ambos grupos de pacientes.
4. No se observó una relación estadísticamente significativa entre la abundancia relativa de las poblaciones de linfocitos PD-1+/CD45+, PD-1+/CD45- y la actividad clínica de los pacientes.
5. Se requieren más estudios para evaluar los factores que podrían influir en el cambio de los niveles de PD-1 en la superficie de las células linfocíticas de pacientes indígenas con AR.

## 12. BIBLIOGRAFIA

1. McInnes, I.B. and G. Schett, *The pathogenesis of rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 2011. **365**(23): p. 2205-19.
2. Smolen, J.S., D. Aletaha, and I.B. McInnes, *Rheumatoid arthritis*. Lancet, 2016. **388**(10055): p. 2023-2038.
3. McInnes, I.B. and G. Schett, *Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis*. Lancet, 2017. **389**(10086): p. 2328-2337.
4. Grassi, W., et al., *The clinical features of rheumatoid arthritis*. Eur J Radiol, 1998. **27 Suppl 1**: p. S18-24.
5. Mota, L.M., et al., *Guidelines for the diagnosis of rheumatoid arthritis*. Rev Bras Reumatol, 2013. **53**(2): p. 141-57.
6. Smolen, J.S., D. Aletaha, and K. Redlich, *The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data?* Nat Rev Rheumatol, 2012. **8**(4): p. 235-43.
7. Lagrutta, M., et al., *Severe extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis in absence of concomitant joint involvement following long-term spontaneous remission. A case report*. Reumatol Clin, 2016. **12**(4): p. 223-5.
8. Scott, I.C., et al., *Predicting the risk of rheumatoid arthritis and its age of onset through modelling genetic risk variants with smoking*. PLoS Genet, 2013. **9**(9): p. e1003808.
9. Okada, Y., et al., *Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery*. Nature, 2014. **506**(7488): p. 376-81.
10. Gregersen, P.K., J. Silver, and R.J. Winchester, *The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1987. **30**(11): p. 1205-13.
11. Valenzuela-Castano, A., et al., *The predictive value of the HLA shared epitope for severity of radiological joint damage in patients with rheumatoid arthritis. A 10 year observational prospective study*. J Rheumatol, 2000. **27**(3): p. 571-4.
12. Morgan, A.W., et al., *Reevaluation of the interaction between HLA-DRB1 shared epitope alleles, PTPN22, and smoking in determining susceptibility to autoantibody-positive and autoantibody-negative rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(9): p. 2565-76.
13. Aletaha, D. and J.S. Smolen, *Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review*. JAMA, 2018. **320**(13): p. 1360-1372.
14. van der Woude, D., et al., *Gene-environment interaction influences the reactivity of autoantibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis*. Nat Genet, 2010. **42**(10): p. 814-6; author reply 816.
15. Scherer, H.U., T. Haupl, and G.R. Burmester, *The etiology of rheumatoid arthritis*. J Autoimmun, 2020. **110**: p. 102400.
16. Rodriguez-Elias, A.K., et al., *Genética y genómica en artritis reumatoide (AR): una actualización*. Gac Med Mex, 2016. **152**: p. 218-227.
17. Bergot, A.S., R. Giri, and R. Thomas, *The microbiome and rheumatoid arthritis*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2020: p. 101497.
18. König, M.F., et al., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis*. Sci Transl Med, 2016. **8**(369): p. 369ra176.

19. Nakagawa, K., et al., *Direct evidence for the expression of multiple endogenous retroviruses in the synovial compartment in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1997. **40**(4): p. 627-38.
20. Levitsky, A., et al., *Obesity is a strong predictor of worse clinical outcomes and treatment responses in early rheumatoid arthritis: results from the SWEFOT trial*. *RMD Open*, 2017. **3**(2): p. e000458.
21. Xibille-Friedmann, D.X., et al., *Leptin and adiponectin as predictors of disease activity in rheumatoid arthritis*. *Clin Exp Rheumatol*, 2015. **33**(4): p. 471-7.
22. Bustos Rivera-Bahena, C., et al., *Peripheral blood leptin and resistin levels as clinical activity biomarkers in Mexican Rheumatoid Arthritis patients*. *Reumatol Clin*, 2016. **12**(6): p. 323-326.
23. Smolen, J.S., et al., *Rheumatoid arthritis*. *Nat Rev Dis Primers*, 2018. **4**: p. 18001.
24. Myasoedova, E., et al., *Is the epidemiology of rheumatoid arthritis changing? Results from a population-based incidence study, 1985-2014*. *Ann Rheum Dis*, 2020. **79**(4): p. 440-444.
25. Karlson, E.W., et al., *Association of environmental and genetic factors and gene-environment interactions with risk of developing rheumatoid arthritis*. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2013. **65**(7): p. 1147-56.
26. Catrina, A.I., K.D. Deane, and J.U. Scher, *Gene, environment, microbiome and mucosal immune tolerance in rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2016. **55**(3): p. 391-402.
27. Asif Amin, M., D.A. Fox, and J.H. Ruth, *Synovial cellular and molecular markers in rheumatoid arthritis*. *Semin Immunopathol*, 2017. **39**(4): p. 385-393.
28. Pawlowska, J., et al., *Different pattern of T-cell subpopulations in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis at various stages of disease development*. *Pol Arch Med Wewn*, 2014. **124**(1-2): p. 43-50.
29. Tulusso, B., et al., *Synovial B cells of rheumatoid arthritis express ZAP-70 which increases the survival and correlates with the inflammatory and autoimmune phenotype*. *Clin Immunol*, 2009. **131**(1): p. 98-108.
30. Zhang, F., et al., *Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry*. *Nat Immunol*, 2019. **20**(7): p. 928-942.
31. McInnes, I.B., C.D. Buckley, and J.D. Isaacs, *Cytokines in rheumatoid arthritis - shaping the immunological landscape*. *Nat Rev Rheumatol*, 2016. **12**(1): p. 63-8.
32. Kvien, T.K., *Epidemiology and burden of illness of rheumatoid arthritis*. *Pharmacoeconomics*, 2004. **22**(2 Suppl 1): p. 1-12.
33. Myasoedova, E., et al., *Epidemiology of rheumatoid arthritis: rheumatoid arthritis and mortality*. *Curr Rheumatol Rep*, 2010. **12**(5): p. 379-85.
34. Alvarez-Nemegyei, J., et al., *Prevalence of musculoskeletal pain and rheumatic diseases in the southeastern region of Mexico. A COPCORD-based community survey*. *J Rheumatol Suppl*, 2011. **86**: p. 21-5.
35. Pelaez-Ballestas, I., et al., *Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology*. *J Rheumatol Suppl*, 2011. **86**: p. 3-8.
36. Zepeda, D., et al. *Tamizaje en enfermedades reumáticas y dermatológicas en comunidades tzotziles*. in *XLVII Congreso Mexicano de Reumatología*. 2018. Chihuahua, México: Reumatología Clínica.

37. Carmona, L., et al., *The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain*. Rheumatology (Oxford), 2002. **41**(1): p. 88-95.
38. Alamanos, Y., P.V. Voulgari, and A.A. Drosos, *Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review*. Semin Arthritis Rheum, 2006. **36**(3): p. 182-8.
39. Burmester, G.R., E. Feist, and T. Dorner, *Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2014. **10**(2): p. 77-88.
40. Burska, A., M. Boissinot, and F. Ponchel, *Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 545493.
41. Furst, D.E. and P. Emery, *Rheumatoid arthritis pathophysiology: update on emerging cytokine and cytokine-associated cell targets*. Rheumatology (Oxford), 2014. **53**(9): p. 1560-9.
42. McInnes, I.B. and G. Schett, *Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 429-42.
43. Xibille-Friedmann, D., et al., *Two-year follow-up of plasma leptin and other cytokines in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(5): p. 930-1.
44. Bustos Rivera-Bahena, C., *Evaluación in vitro del efecto inflamatorio de adipocitocinas en células mononucleares derivadas de sangre periférica, así como la asociación de sus niveles circulantes con la actividad clínica de pacientes con Artritis Reumatoide*, in *INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR*. 2019, Universidad Autónoma del Estado de Morelos: Cuernavaca, Morelos, Mexico. p. 139 pages.
45. Kremer, J.M., et al., *Long-term study of the impact of methotrexate on serum cytokines and lymphocyte subsets in patients with active rheumatoid arthritis: correlation with pharmacokinetic measures*. RMD Open, 2016. **2**(1): p. e000287.
46. Orr, C., et al., *Synovial Immunophenotype and Anti-Citrullinated Peptide Antibodies in Rheumatoid Arthritis Patients: Relationship to Treatment Response and Radiologic Prognosis*. Arthritis Rheumatol, 2017. **69**(11): p. 2114-2123.
47. Teitsma, X.M., et al., *Explorative analyses of protein biomarkers in patients with early rheumatoid arthritis achieving sustained drug-free remission after treatment with tocilizumab- or methotrexate-based strategies: from transcriptomics to proteomics*. Clin Exp Rheumatol, 2018. **36**(6): p. 976-983.
48. Alivernini, S., et al., *Differential synovial tissue biomarkers among psoriatic arthritis and rheumatoid factor/anti-citrulline antibody-negative rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2019. **21**(1): p. 116.
49. Bader, L., et al., *Candidate Markers for Stratification and Classification in Rheumatoid Arthritis*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1488.
50. Leite Pereira, A., et al., *Characterization of Phenotypes and Functional Activities of Leukocytes From Rheumatoid Arthritis Patients by Mass Cytometry*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2384.
51. Vargas-Rojas, M., et al., *PD-1 y sus ligandos como reguladores de la respuesta inmune*. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de Mexico, 2008. **21**(4): p. 272-279.
52. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 677-704.
53. Pinedo-Donelli, S. and E. Ball de Picon, *PD-1 y sus ligandos: importancia en dermatología*. Med Cutan Iber Lat Am, 2018. **46**(1): p. 30-37.

54. Nishimura, H., et al., *Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor*. *Immunity*, 1999. **11**(2): p. 141-51.
55. Nielsen, C., et al., *A putative regulatory polymorphism in PD-1 is associated with nephropathy in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients*. *Lupus*, 2004. **13**(7): p. 510-6.
56. Prokunina, L., et al., *Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(6): p. 1770-3.
57. Greisen, S.R., et al., *Increased soluble programmed death-1 (sPD-1) is associated with disease activity and radiographic progression in early rheumatoid arthritis*. *Scand J Rheumatol*, 2014. **43**(2): p. 101-8.
58. Li, S., et al., *Expression of programmed death-1 (PD-1) on CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis*. *Inflammation*, 2014. **37**(1): p. 116-21.
59. Bartosinska, J., et al., *Differential expression of programmed death 1 (PD-1) on CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis*. *Pol Arch Intern Med*, 2017. **127**(12): p. 815-822.
60. Guo, Y., et al., *Immune checkpoint inhibitor PD-1 pathway is down-regulated in synovium at various stages of rheumatoid arthritis disease progression*. *PLoS One*, 2018. **13**(2): p. e0192704.
61. Koohini, Z., et al., *Analysis of PD-1 and Tim-3 expression on CD4(+) T cells of patients with rheumatoid arthritis; negative association with DAS28*. *Clin Rheumatol*, 2018. **37**(8): p. 2063-2071.
62. Matsuda, K., et al., *Clinicopathological value of programmed cell death 1 (PD-1) and programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression in synovium of patients with rheumatoid arthritis*. *Clin Exp Med*, 2018. **18**(4): p. 487-494.
63. Cao, G., et al., *CD4+CXCR5+PD-1+ T Follicular Helper Cells Play a Pivotal Role in the Development of Rheumatoid Arthritis*. *Med Sci Monit*, 2019. **25**: p. 3032-3040.
64. Fortea-Gordo, P., et al., *Two populations of circulating PD-1hiCD4 T cells with distinct B cell helping capacity are elevated in early rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2019. **58**(9): p. 1662-1673.
65. Schutyser, E., S. Struyf, and J. Van Damme, *The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003. **14**(5): p. 409-26.
66. Comerford, I., et al., *An immune paradox: how can the same chemokine axis regulate both immune tolerance and activation?: CCR6/CCL20: a chemokine axis balancing immunological tolerance and inflammation in autoimmune disease*. *Bioessays*, 2010. **32**(12): p. 1067-76.
67. Paulissen, S.M., et al., *The role and modulation of CCR6+ Th17 cell populations in rheumatoid arthritis*. *Cytokine*, 2015. **74**(1): p. 43-53.
68. Paulissen, S.M., et al., *CCR6(+) Th cell populations distinguish ACPA positive from ACPA negative rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, 2015. **17**: p. 344.
69. Matsui, T., et al., *Selective recruitment of CCR6-expressing cells by increased production of MIP-3 alpha in rheumatoid arthritis*. *Clin Exp Immunol*, 2001. **125**(1): p. 155-61.
70. Ruth, J.H., et al., *Role of macrophage inflammatory protein-3alpha and its ligand CCR6 in rheumatoid arthritis*. *Lab Invest*, 2003. **83**(4): p. 579-88.

71. Henneken, M., et al., *Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Res Ther*, 2005. **7**(5): p. R1001-13.
72. Hirota, K., et al., *Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model*. *J Exp Med*, 2007. **204**(12): p. 2803-12.
73. Lisignoli, G., et al., *CCL20 chemokine induces both osteoblast proliferation and osteoclast differentiation: Increased levels of CCL20 are expressed in subchondral bone tissue of rheumatoid arthritis patients*. *J Cell Physiol*, 2007. **210**(3): p. 798-806.
74. Lisignoli, G., et al., *CCL20/CCR6 chemokine/receptor expression in bone tissue from osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients: different response of osteoblasts in the two groups*. *J Cell Physiol*, 2009. **221**(1): p. 154-60.
75. Tanida, S., et al., *CCL20 produced in the cytokine network of rheumatoid arthritis recruits CCR6+ mononuclear cells and enhances the production of IL-6*. *Cytokine*, 2009. **47**(2): p. 112-8.
76. Kochi, Y., et al., *A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility*. *Nat Genet*, 2010. **42**(6): p. 515-9.
77. Yamada, H., et al., *Preferential accumulation of activated Th1 cells not only in rheumatoid arthritis but also in osteoarthritis joints*. *J Rheumatol*, 2011. **38**(8): p. 1569-75.
78. Teng, E., et al., *Analysis of a genome-wide association study-linked locus (CCR6) in Asian rheumatoid arthritis*. *DNA Cell Biol*, 2012. **31**(4): p. 607-10.
79. Li, N., et al., *The abnormal expression of CCR4 and CCR6 on Tregs in rheumatoid arthritis*. *Int J Clin Exp Med*, 2015. **8**(9): p. 15043-53.
80. Leng, R.X., et al., *Evidence of epistatic interaction between DPP4 and CCR6 in patients with rheumatoid arthritis*. *Rheumatology (Oxford)*, 2016. **55**(12): p. 2230-2236.
81. Sucur, A., et al., *Combined manual and automated immunophenotypisation identified disease-specific peripheral blood immune subpopulations in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis*. *Clin Exp Rheumatol*, 2019.
82. Takaki-Kuwahara, A., et al., *CCR6+ group 3 innate lymphoid cells accumulate in inflamed joints in rheumatoid arthritis and produce Th17 cytokines*. *Arthritis Res Ther*, 2019. **21**(1): p. 198.
83. Wang, Y., et al., *Rheumatoid arthritis patients display B-cell dysregulation already in the naive repertoire consistent with defects in B-cell tolerance*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 19995.
84. Murray, C.J., et al., *Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. *Lancet*, 2012. **380**(9859): p. 2197-223.
85. Cross, M., et al., *The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study*. *Ann Rheum Dis*, 2014. **73**(7): p. 1316-22.
86. Gabriel, W.A.D.S., *Overcoming challenges in order to improve the management of rheumatic and musculoskeletal diseases across the globe*. *Clinical Rheumatology*, 2015. **34**: p. 815-817.
87. Klareskog, L., P.K. Gregersen, and T.W. Huizinga, *Prevention of autoimmune rheumatic disease: state of the art and future perspectives*. *Ann Rheum Dis*, 2010. **69**(12): p. 2062-6.

88. Alarcon, A.M., et al., *Contribution of ethnic group and socioeconomic status to degree of disability in rheumatoid arthritis in Chilean patients*. *Rheumatol Int*, 2015. **35**(4): p. 685-9.
89. Boyer, G.S., et al., *Prevalence of rheumatoid arthritis in circumpolar native populations*. *J Rheumatol*, 1998. **25**(1): p. 23-9.
90. Roberts-Thomson, R.A. and P.J. Roberts-Thomson, *Rheumatic disease and the Australian aborigine*. *Ann Rheum Dis*, 1999. **58**(5): p. 266-70.
91. Peschken, C.A. and J.M. Esdaile, *Rheumatic diseases in North America's indigenous peoples*. *Semin Arthritis Rheum*, 1999. **28**(6): p. 368-91.
92. Griffiths, B., et al., *Racial origin and its effect on disease expression and HLA-DRB1 types in patients with rheumatoid arthritis: a matched cross-sectional study*. *Rheumatology (Oxford)*, 2000. **39**(8): p. 857-64.
93. McGill, P.E. and G.O. Oyoo, *Rheumatic disorders in Sub-saharan Africa*. *East Afr Med J*, 2002. **79**(4): p. 214-6.
94. Lombard, Z., et al., *HLA class II disease associations in southern Africa*. *Tissue Antigens*, 2006. **67**(2): p. 97-110.
95. Ferucci, E.D., D.W. Templin, and A.P. Lanier, *Rheumatoid arthritis in American Indians and Alaska Natives: a review of the literature*. *Semin Arthritis Rheum*, 2005. **34**(4): p. 662-7.
96. Yan, Z., et al., *Resequencing of the human major histocompatibility complex in patients with rheumatoid arthritis and healthy controls in Alaska Natives of Southeast Alaska*. *Tissue Antigens*, 2007. **70**(6): p. 487-94.
97. Ferucci, E.D., et al., *Performance on rheumatoid arthritis quality indicators in an Alaska Native healthcare system*. *Qual Saf Health Care*, 2010. **19**(5): p. 387-91.
98. Chipeta, J., et al., *Clinical patterns of juvenile idiopathic arthritis in Zambia*. *Pediatr Rheumatol Online J*, 2013. **11**(1): p. 33.
99. Ferucci, E.D., et al., *Prevalence of anti-peptidylarginine deiminase type 4 antibodies in rheumatoid arthritis and unaffected first-degree relatives in indigenous North American Populations*. *J Rheumatol*, 2013. **40**(9): p. 1523-8.
100. Del Rio Najera, D., et al., *Prevalence of rheumatic diseases in Raramuri people in Chihuahua, Mexico: a community-based study*. *Clin Rheumatol*, 2016. **35 Suppl 1**: p. 43-52.
101. Granados, Y., et al., *Prevalence of musculoskeletal disorders and rheumatic disease in the Warao, Kari'na, and Chaima indigenous populations of Monagas State, Venezuela*. *Clin Rheumatol*, 2016. **35 Suppl 1**: p. 53-61.
102. Julian-Santiago, F., et al., *Epidemiology of rheumatic diseases in Mixtec and Chontal indigenous communities in Mexico: a cross-sectional community-based study*. *Clin Rheumatol*, 2016. **35 Suppl 1**: p. 35-42.
103. Koppejan, H., et al., *Role of Anti-Carbamylated Protein Antibodies Compared to Anti-Citrullinated Protein Antibodies in Indigenous North Americans With Rheumatoid Arthritis, Their First-Degree Relatives, and Healthy Controls*. *Arthritis Rheumatol*, 2016. **68**(9): p. 2090-8.
104. Pelaez-Ballestas, I., et al., *Prevalence and factors associated with musculoskeletal disorders and rheumatic diseases in indigenous Maya-Yucateco people: a cross-sectional community-based study*. *Clin Rheumatol*, 2016. **35 Suppl 1**: p. 15-23.
105. Quintana, R., et al., *Prevalence of musculoskeletal disorders and rheumatic diseases in the indigenous Qom population of Rosario, Argentina*. *Clin Rheumatol*, 2016. **35 Suppl 1**: p. 5-14.

106. Anaparti, V., et al., *Whole blood microRNA expression pattern differentiates patients with rheumatoid arthritis, their seropositive first-degree relatives, and healthy unrelated control subjects*. *Arthritis Res Ther*, 2017. **19**(1): p. 249.
107. Guevara-Pacheco, S.V., et al., *Prevalence of Disability in Patients With Musculoskeletal Pain and Rheumatic Diseases in a Population From Cuenca, Ecuador*. *J Clin Rheumatol*, 2017. **23**(6): p. 324-329.
108. Scally, S.W., et al., *Molecular basis for increased susceptibility of Indigenous North Americans to seropositive rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2017. **76**(11): p. 1915-1923.
109. Barnabe, C., et al., *Patient-reported Outcomes, Resource Use, and Social Participation of Patients with Rheumatoid Arthritis Treated with Biologics in Alberta: Experience of Indigenous and Non-indigenous Patients*. *J Rheumatol*, 2018. **45**(6): p. 760-765.
110. Barnabe, C., et al., *Effectiveness, Complications, and Costs of Rheumatoid Arthritis Treatment with Biologics in Alberta: Experience of Indigenous and Non-indigenous Patients*. *J Rheumatol*, 2018. **45**(10): p. 1344-1352.
111. Quintana, R., et al., *Rheumatoid arthritis in the indigenous qom population of Rosario, Argentina: aggressive and disabling disease with inadequate adherence to treatment in a community-based cohort study*. *Clin Rheumatol*, 2018. **37**(9): p. 2323-2330.
112. Pelaez-Ballestas, I., et al., *Epidemiology and socioeconomic impact of the rheumatic diseases on indigenous people: an invisible syndemic public health problem*. *Ann Rheum Dis*, 2018. **77**(10): p. 1397-1404.
113. Anaparti, V., et al., *Whole Blood Targeted Bisulfite Sequencing Validates Differential Methylation in C6ORF10 gene of Patients with Rheumatoid Arthritis*. *J Rheumatol*, 2019.
114. Tanner, S., et al., *A Prospective Study of the Development of Inflammatory Arthritis in the Family Members of Indigenous North American People With Rheumatoid Arthritis*. *Arthritis Rheumatol*, 2019. **71**(9): p. 1494-1503.
115. Pelaez-Ballestas, I., et al., *Culture-sensitive adaptation and validation of the community-oriented program for the control of rheumatic diseases methodology for rheumatic disease in Latin American indigenous populations*. *Rheumatol Int*, 2014. **34**(9): p. 1299-309.
116. Zepeda, D., et al., *TAMIZAJE DE ENFERMEDADES REUMÁTICAS Y DERMATOLÓGICAS EN COMUNIDADES TZOTZILES*. *Reumatol Clin*, 2018. **14**(6).
117. Hitchon, C.A., et al., *Differences in inflammatory arthritis activity across mexican mestizos, canadian native indians and canadian caucasians*. *J Rheumatol* (submitted), 2017.
118. Moreno-Montoya, J., et al., *Association of regional and cultural factors with the prevalence of rheumatoid arthritis in the Mexican population: a multilevel analysis*. *J Clin Rheumatol*, 2015. **21**(2): p. 57-62.
119. Wang, S., et al., *Geographic patterns of genome admixture in Latin American Mestizos*. *PLoS Genet*, 2008. **4**(3): p. e1000037.
120. Kochi, Y., et al., *Ethnogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis-implications for pathogenesis*. *Nat Rev Rheumatol*, 2010. **6**(5): p. 290-5.
121. Townsend, M.J., *Molecular and cellular heterogeneity in the Rheumatoid Arthritis synovium: clinical correlates of synovitis*. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2014. **28**(4): p. 539-49.

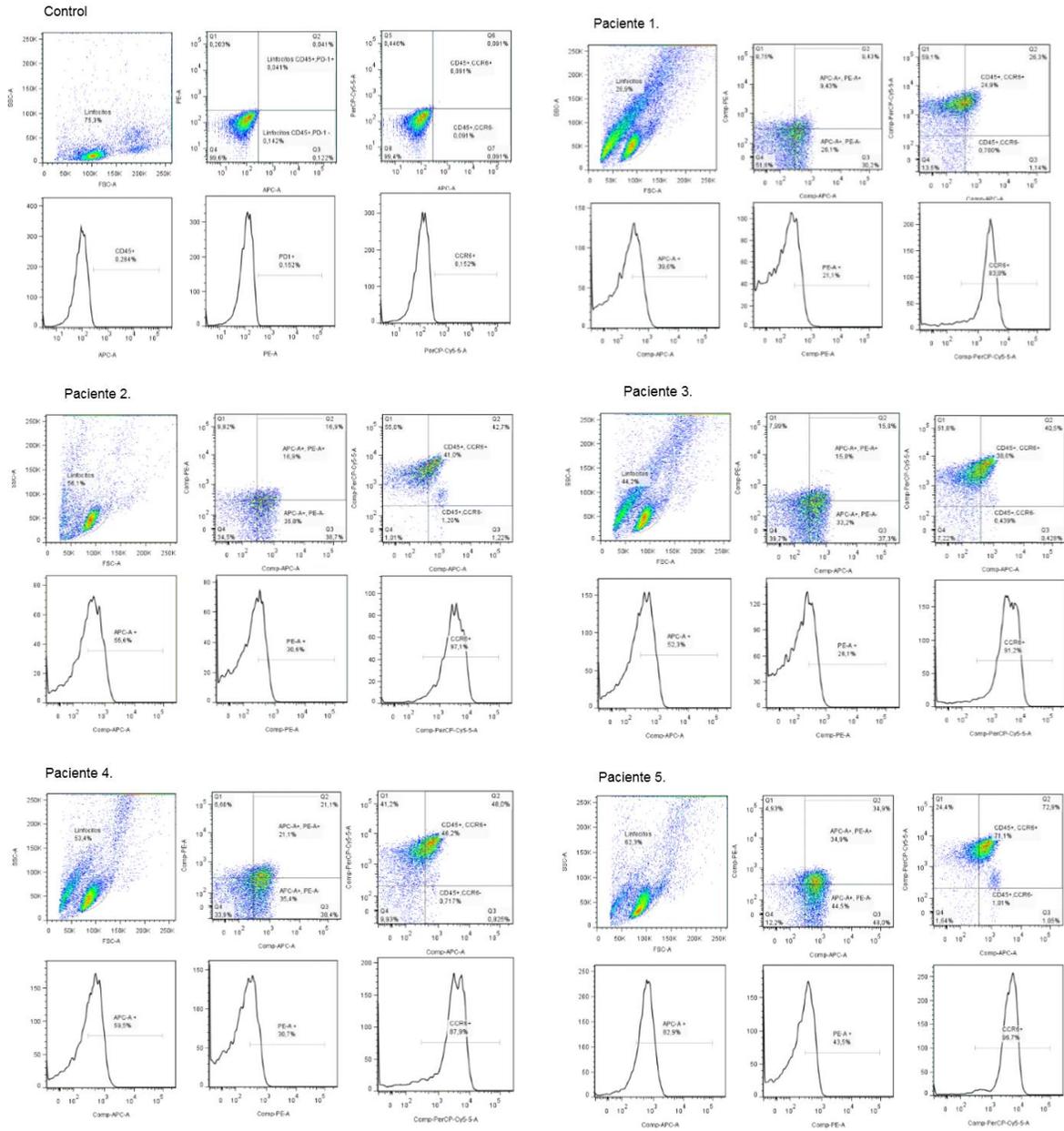
122. Fonseka, C.Y., D.A. Rao, and S. Raychaudhuri, *Leveraging blood and tissue CD4+ T cell heterogeneity at the single cell level to identify mechanisms of disease in rheumatoid arthritis*. *Curr Opin Immunol*, 2017. **49**: p. 27-36.
123. Petrackova, A., et al., *Revealed heterogeneity in rheumatoid arthritis based on multivariate innate signature analysis*. *Clin Exp Rheumatol*, 2020. **38**(2): p. 289-298.
124. Matthijssen, X.M.E., et al., *Enhanced treatment strategies and distinct disease outcomes among autoantibody-positive and -negative rheumatoid arthritis patients over 25 years: A longitudinal cohort study in the Netherlands*. *PLoS Med*, 2020. **17**(9): p. e1003296.
125. Mariotti, F.R., et al., *Innate Lymphoid Cells: Expression of PD-1 and Other Checkpoints in Normal and Pathological Conditions*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 910.
126. Lee, A.Y. and H. Korner, *CCR6 and CCL20: emerging players in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Immunol Cell Biol*, 2014. **92**(4): p. 354-8.
127. Darmawan, J. Recommendations from the Community Oriented Program for Control of Rheumatic Disease for data collection for the measurement and monitoring of health in developing countries. *Clin Rheumatol* **26**, 853–857 (2007). <https://doi.org/10.1007/s10067-007-0553-x>

# ANEXO A

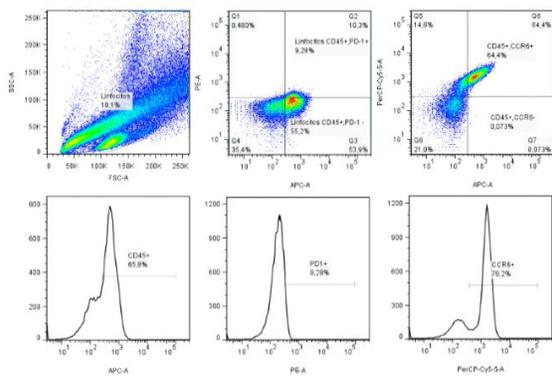
	<p><b>CONSENTIMIENTO INFORMADO</b></p> <p><b>SERVICIO DE REUMATOLOGÍA, HOSPITAL GENERAL DE CUERNAVACA, "DR. JOSÉ G. PARRES"</b></p>																			
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;"><b>Número de Expediente</b></td> <td style="width: 10%;"></td> </tr> </table>	<b>Número de Expediente</b>												<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%;"><b>Fecha</b></td> <td style="width: 15%;"></td> </tr> </table>		<b>Fecha</b>					
<b>Número de Expediente</b>																				
<b>Fecha</b>																				
<p><i>Estimado(a) Señor/Señora:</i></p> <p><b>Introducción/Objetivos:</b> La Facultad de Farmacia de la UAEM, está realizando un proyecto de investigación el cual tiene como objetivo evaluar la relación entre los niveles de <i>citocinas pro-inflamatorias</i> y <i>células sanguíneas CD4<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup></i> con la <i>actividad clínica de pacientes con Artritis Reumatoide</i> en población indígena e identificar diferencias y similitudes con población urbanizada, el cual nos permitiría orientar a su reumatólogo sobre los mejores esquemas de tratamiento.</p> <p><b>Procedimientos:</b> Si Usted acepta participar en el estudio, ocurrirá lo siguiente: dentro de la consulta con su reumatólogo en el Hospital Dr. José G. Parres, personal calificado procederá a extraer aproximadamente 10 mL de sangre, los cuales serán tomados en tres tubos. Todo el procedimiento se realizará en condiciones asépticas y con material nuevo.</p> <p><b>Beneficios:</b> Usted no contará con un beneficio directamente, sin embargo, el análisis de sus muestras aportarán un mayor entendimiento y conocimiento acerca de las moléculas implicadas en el desarrollo de la enfermedad. Adicionalmente usted estará colaborando con la Facultad de Farmacia de la UAEM en el estudio de los factores que están asociados al desarrollo y gravedad de la Artritis Reumatoide. Usted no recibirá ningún pago por participar en el estudio, y tampoco implicará algún costo para usted.</p> <p><b>Confidencialidad:</b> Toda la información que Usted nos proporcione para el estudio será de carácter estrictamente confidencial, será utilizada únicamente por el equipo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Usted quedará identificado(a) con un número de folio y no con su nombre. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos, pero se presentarán de tal manera que no podrá ser identificado(a).</p> <p><b>Riesgos Potenciales:</b> Los riesgos potenciales que implican su participación en este estudio son mínimos. Si alguna de las preguntas le hicieran sentir un poco incómodo(a), tiene el derecho de no responderla. No esta demás comentarle que durante la toma de muestras no existe ningún riesgo hacia su persona. Posterior a la toma de sangre puede quedar un pequeño moretón en la zona de punción, el cual se quitará en los próximos días.</p> <p><b>Participación Voluntaria/Retiro:</b> La participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de negarse a participar o de retirar su participación del mismo en cualquier momento. Su decisión de participar o de no participar no afectará de ninguna manera su atención en el Hospital.</p> <p><b>Números a Contactar:</b> Si usted tiene alguna pregunta, comentario o preocupación con respecto al proyecto, por favor comuníquese con el/la investigador/a responsable del proyecto: <b>Dr. José Luis Montiel Hernández</b> al siguiente número de teléfono (777) 3297000 ext: 3371 en un horario de lunes a viernes de 10:00 am a 18:00 pm.</p> <p><b>Declaración de consentimiento informado:</b> Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato. Acepto participar voluntariamente en esta investigación.</p>																				
<hr style="width: 100%;"/> <p><b>Nombre y firma del participante</b></p>	<hr style="width: 100%;"/> <p><b>Nombre y firma del testigo</b></p>	<hr style="width: 100%;"/> <p><b>Nombre y firma del investigador</b></p>																		

# ANEXO B

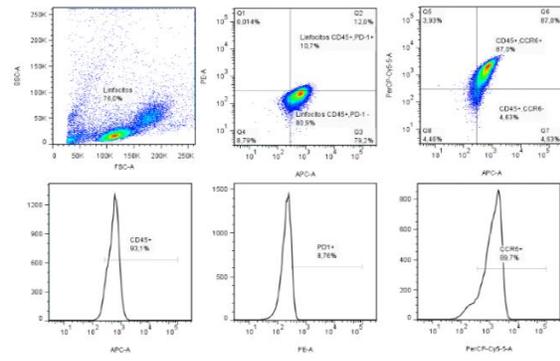
## - Pacientes urbanos



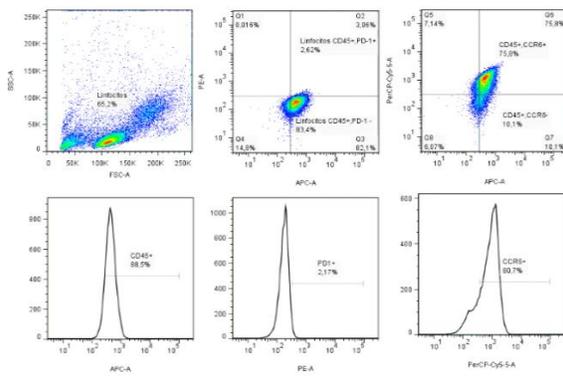
Paciente 6.



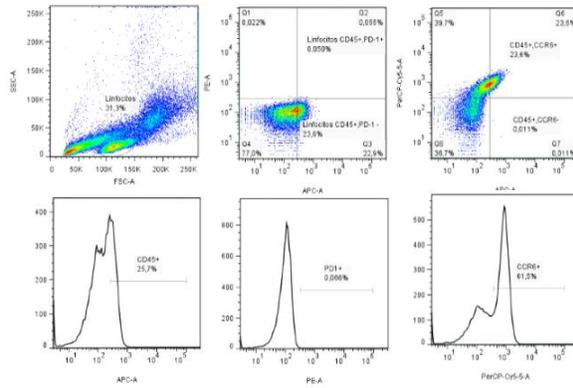
Paciente 7.



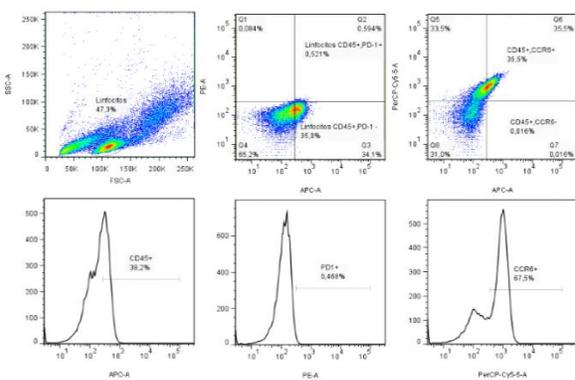
Paciente 8.



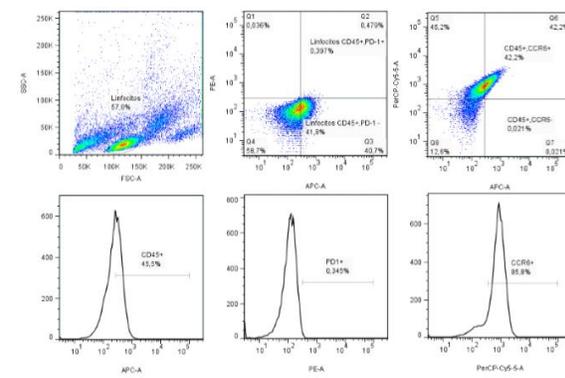
Paciente 9.



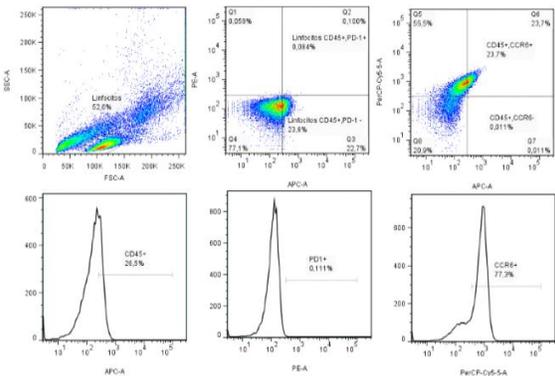
Paciente 10.



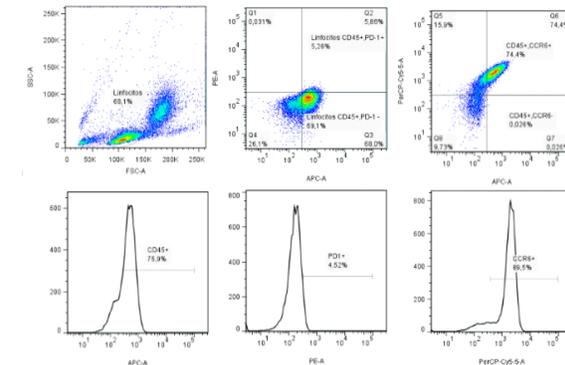
Paciente 11.

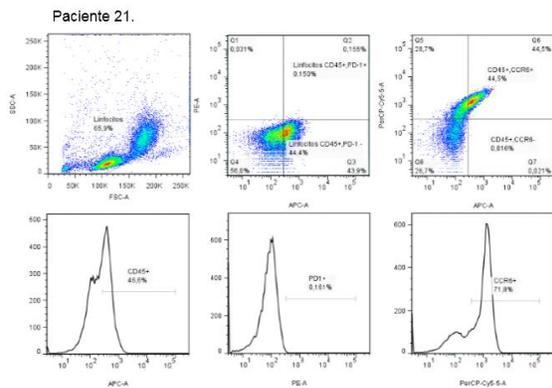
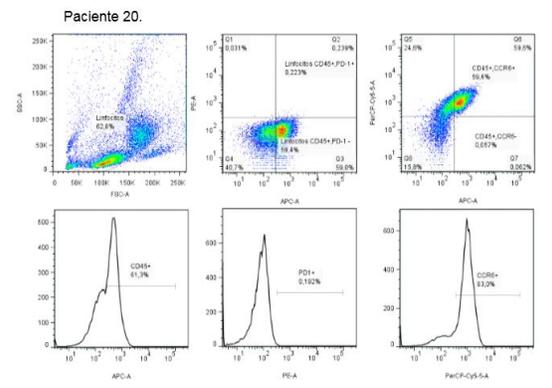
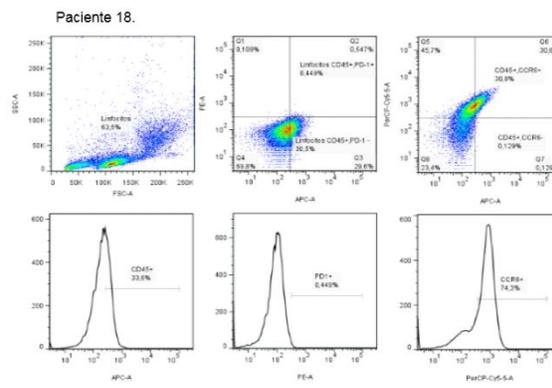
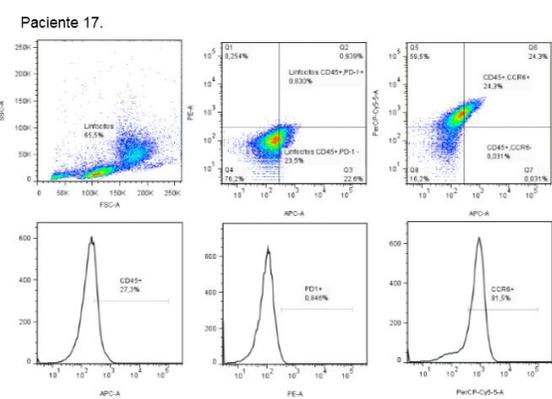
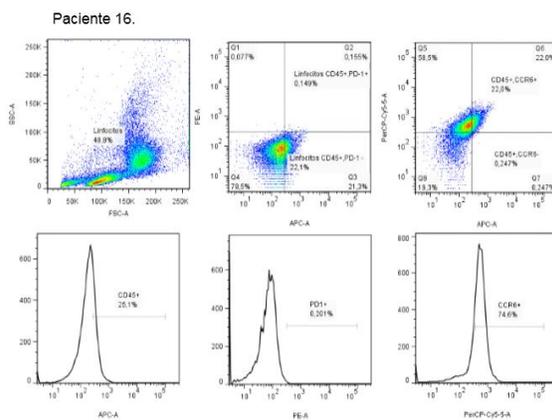
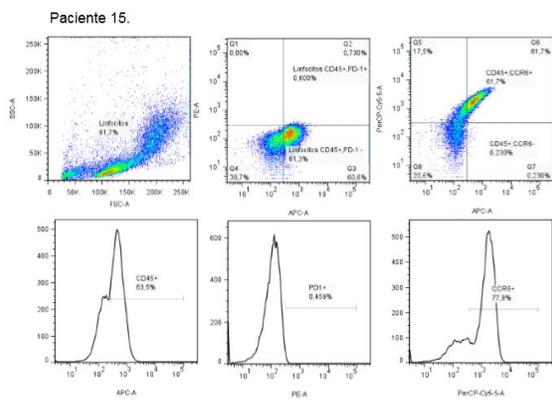
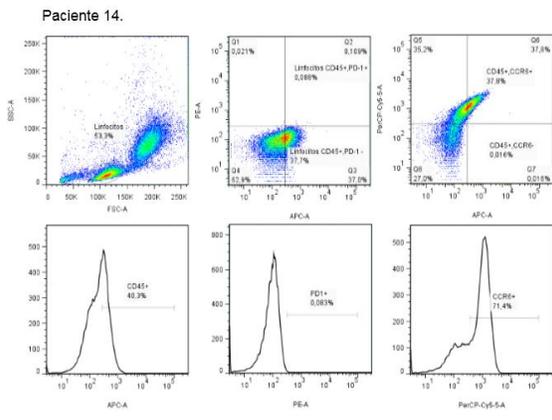


Paciente 12.



Paciente 13.





- Pacientes indígenas.

