



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE DINÁMICA MOLECULAR

**“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”**

## **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

***DOCTOR EN CIENCIAS***

PRESENTA

**CAROLINA BUSTOS RIVERA BAHENA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. JOSÉ LUIS MONTIEL HERNÁNDEZ**

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2019



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE DINÁMICA MOLECULAR

**“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”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

***DOCTOR EN CIENCIAS***

PRESENTA

**CAROLINA BUSTOS RIVERA BAHENA**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. JOSÉ LUIS MONTIEL HERNÁNDEZ**

**JURADO REVISOR**

DRA. JANITZIA VÁZQUEZ MELLADO

DR. IVÁN MARTÍNEZ DUNCKER

DRA. JUDITH GONZÁLEZ CHRISTEN

DR. FERNANDO ESQUIVEL GUADARRAMA

DR. GUSTAVO PEDRAZA ALVA

DR. DANIEL XAVIER XIBILLE FRIEDMANN

DRA. LETICIA GONZÁLEZ MAYA

Este proyecto fue realizado en el laboratorio de Citocinas y Autoinmunidad de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y con el apoyo financiero del proyecto CONACYT CB2010-1 (155392). Asimismo, durante este período se obtuvo apoyo del CONACyT para beca de doctorado (210417).

## AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis Dr. José Luis Montiel Hernández

A mis hermanas, Genoveva y Catalina

A mi esposo y a mis hijos



**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS**

Coordinación de Programas Educativos

Posgrado en Ciencias



**DR. VÍCTOR BARBA LÓPEZ**  
**COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS**  
**PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada *"Evaluación in vitro 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"* que presenta la alumna **Carolina Bustos Rivera Bahena (5920100508)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Janitzia Vázquez Mellado Reumatología Hospital General de México	Aprobatorio	
Dr. Iván Martínez Duncker CIDC-UAEM	APROBATORIO	
Dra. Judith González Christen FF-UAEM	Aprobatorio	
Dr. Fernando Esquivel Guadarrama FM-UAEM	APROBATORIO	
Dr. Gustavo Pedraza Alva IBT-UNAM	Aprobatorio	
Dr. Daniel Xavier Xibille Friedmann Hospital General de Cuernavaca	Aprobada	
Dra. Leticia González Maya FF-UAEM	Aprobatorio	

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	i
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	iii
<b>GLOSARIO</b>	iv
<b>RESUMEN</b>	vii
<b>ABSTRACT</b>	xi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1 ARTRITIS REUMATOIDE	1
1.1.1 Etiología	1
1.1.2 Fisiopatología	28
1.1.3 Tratamiento	17
1.2 ADIPOCITOCINAS	19
1.2.1 Leptina	26
1.2.2 Adiponectina	31
1.2.3 Resistina	34
1.2.4 Adipocitocinas y Artritis Reumatoide	37
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	40
<b>3. HIPÓTESIS</b>	42
<b>4. OBJETIVOS</b>	43
4.1 Objetivo general	43
4.2 Objetivos particulares	44
<b>5. MATERIALES Y METODOS</b>	44
5.1 Diseño del estudio	44

5.2 Colecta de muestras	44
5.2.1 Pacientes	44
5.2.2 Donadores	45
5.3 Línea Celular	46
5.4 Purificación de Células Mononucleares derivadas de Sangre Periférica	46
5.5 Purificación de Linfocitos T CD4 <sup>+</sup>	47
5.6 Ensayos de Proliferación Celular	48
5.7 Determinación de Marcadores de Activación: CD69 y CD25	48
5.8 Determinación de la Activación de STAT3	48
5.9 Evaluación de la Inducción de ROR <sub>γ</sub> T	50
5.10 Determinación de la Resistencia a la Muerte Celular	51
5.11 Optimización de Protocolos de Cuantificación por ELISA	52
5.11.1 Pre-Incubación	53
5.11.2 Bloqueo y primer anticuerpo	54
5.11.3 Anticuerpo secundario	54
5.11.4 Revelado	54
5.12 Evaluación de niveles plasmáticos de Adipocitocinas y Citocinas	55
5.12.1 ELISA para Leptina	55
5.12.2 ELISA para Adiponectina	55
5.12.3 ELISA para Resistina	56
5.12.4 ELISA para TNF $\alpha$	57
5.12.5 ELISA para IL-2	58
5.12.6 ELISA para IL-6	59
5.12.7 ELISA para IL-17	59
5.13 Evaluación Clínica	60
5.14 Análisis Estadístico	61

<b>6. RESULTADOS</b>	61
6.1 Estudio <i>in vitro</i>	61
6.1.1. Generalidades de donadores y pacientes	62
6.1.2. Efecto sobre la proliferación celular	70
6.1.3. Activación de la vía de STAT	73
6.1.4. Efecto sobre la expresión del receptor para leptina	
6.1.5. Efecto sobre marcadores de activación CD25 y CD69.	73
6.1.6. Efecto sobre el rescate de muerte celular	79
6.1.7. Efecto sobre diferenciación del fenotipo Th17	80
6.2 Estudio Clínico	84
6.2.1. Datos generales de donadores y pacientes	85
6.2.2. Comparación entre niveles plasmáticos de adipocitocinas y citocinas pro-inflamatorias	85
6.2.3. Análisis de correlación	90
<b>7. DISCUSIÓN</b>	93
7.1 Estudios <i>in vitro</i>	93
7.1.1 Leptina	93
7.1.2 Adiponectina	97
7.1.3 Fenotipo Th17	98
7.2 Estudio Clínico	101
7.3 Limitaciones del estudio	105
<b>8. CONCLUSIONES</b>	107
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	109
<b>10 REFERENCIAS</b>	110
<b>11. ANEXOS</b>	130



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ubicación de variantes HLA asociadas a riesgo de desarrollo de AR y proteínas anticuerpo citrulinado	3
Figura 2	Vías de señalización relacionadas con la presentación de antígenos y regiones de susceptibilidad al desarrollo de AR	5
Figura 3	Fisiopatogénesis de la Artritis Reumatoide	9
Figura 4	Procesos inmunológicos adaptativos e innatos dentro de la articulación afectada por artritis reumatoide	10
Figura 5	Extravasación de leucocitos hacia el foco de inflamación	15
Figura 6	Potenciales mecanismos por los que la obesidad promueve un estado inflamatorio crónico	21
Figura 7	El exceso de grasas derivadas de un balance energético positivo mantenido en el tiempo, determina la expansión del volumen del tejido adiposo y aumento de macrófagos M1 en el tejido	23
Figura 8	Adipocitocinas: mediadores entre el tejido adiposo, inflamación e inmunidad.	25
Figura 9.	Representación esquemática de la estructura general de los diferentes subtipos de receptores de leptina (ObR).	28
Figura 10	Efectos de Leptina en la respuesta inmune innata y adaptativa	30
Figura 11	Estructura de Adiponectina	31
Figura 12	Vías de señalización activadas por adiponectina en macrófagos	33
Figura 13	Activación a través de resistina a su receptor.	36
Figura 14	Protocolo general de la técnica de ELISA	52
Figura 15	Diseño general de los ensayos para cuantificación de citocinas por ELISA	53
Figura 16	Efecto proliferativo de tratamiento de PHA sobre células Mononucleares	62
Figura 17	Efecto proliferativo de tratamiento de leptina y Adiponectina sobre células Mononucleares	63
Figura 18	Evaluación del enriquecimiento de linfocitos T CD4+ derivados de sangre periférica de donadores	64
Figura 19	Inducción de la proliferación de linfocitos T CD4+ de donadores y pacientes por efecto de Leptina y Adiponectina.	65
Figura 20	Inducción de la proliferación de linfocitos T CD4+ es dependiente de la concentración de leptina.	66
Figura 21	Análisis de correlación entre la actividad clínica (DAS28) y la respuesta proliferativa relativa inducida por leptina o por adiponectina de células CMN de pacientes.	67
Figura 22	Inducción de la secreción de IL-2 por incubación con leptina o adiponectina sobre las células CMN o linfocitos T CD4+ de donadores y de pacientes.	67

Figura 23	Análisis de correlación entre la actividad clínica (DAS28) y la secreción de IL-2 inducida por leptina de células CMN y linfocitos T CD4+ de pacientes	68
Figura 24	Inducción de la respuesta proliferativa y secreción de IL-2 por incubación con leptina o adiponectina sobre linfocitos T CD4+ de donadores y de pacientes	69
Figura 25	La incubación de CMN de donadores con leptina ocasionó la fosforilación y activación de la vía de STAT3.	71
Figura 26	Comparación de la fosforilación de STAT3 inducida por leptina de células CMN de donadores y pacientes con AR	71
Figura 27	Efecto de leptina sobre los niveles de ObR en células CD4+ derivadas de sangre periférica de donadores sanos y pacientes con AR	73
Figura 28	Efecto comparativo de leptina y adiponectina sobre la expresión de marcadores activación tempranos en células CMN y linfocitos T CD4+ derivados de donadores y pacientes con AR.	76
Figura 29	Comparación cuantitativa en el efecto de inducción de CD25 y CD69 por células CMN de donadores y pacientes por leptina o adiponectina	77
Figura 30	Efecto de leptina o adiponectina sobre secreción de IL-1, IL-6 o TNF- $\alpha$ en células de donadores control y pacientes con AR	78
Figura 31	Efecto anti-apoptótico inducido por leptina o adiponectina sobre células CMN de donadores	80
Figura 32	Análisis cuantitativo del efecto anti-apoptótico inducido por leptina o adiponectina sobre células CMN de donadores	81
Figura 33	Efecto del tratamiento por 7 días con leptina sobre expresión del factor de transcripción ROR $\gamma$ T en linfocitos T CD4+ de donadores y pacientes con AR.	82
Figura 34	Respuesta TH17 producida en linfocitos T CD4 + bajo el estímulo de Leptina por 7 días.	84 87
Figura 35	Niveles de leptina en plasma encontrado entre pacientes con AR y donadores	87
Figura 36	Niveles de Adiponectina en plasma de pacientes con AR y donadores.	105
Figura 37	Posible participación de las adipocitocinas en el proceso inflamatorio inducido durante el desarrollo de la Artritis Reumatoide	

## INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Principales Citocinas implicadas durante la AR	12
Tabla 2 Principales moléculas secretadas por el tejido adiposo blanco y función fisiológica	24
Tabla 3 Papel de las adipocitocinas en AR	38
Tabla 4 Datos generales de donadores sanos y pacientes	61
Tabla 5 Datos demográficos de donadores sanos y pacientes.	85
Tabla 6 Tabla comparativa entre pacientes estratificados de acuerdo a la actividad clínica.	90
Tabla 7 Tabla de correlación entre parámetros inflamatorios	

## GLOSARIO

aa	Aminoácidos
Ab	Anticuerpo
ACR	Colegio Americano de Reumatología
Acrp30	Adiponectina
AFA	Anti- Filagrina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
aPCC	Anticuerpos péptido citrulinados Cíclicos
APF	Antifactor perinuclear
AR	Artritis reumatoide
ARN-m	Ácido ribonucleico mensajero
CETS	Centro Estatal de Transfusión Sanguínea
°C	Grados centígrados
DAS28	Índice de actividad clínica para AR
D.O.	Densidad óptica
EDTA	Sal disódica del ácido etilendinitrilo tetracético
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción dependiente de enzimas
ERK	Cinasas de regulación extracelular (Erk 1 y 2)
FARMEs	Fármacos modificadores de la enfermedad
FR	Factor reumatoide
g/ml	Gramo por mililitro
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos
HAQ	Instrumento de Valoración de la Discapacidad.
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HRP	Peroxidasa de rábano
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico
IFN- $\gamma$	Interferón gama
Ig	Inmunoglobulina

IL	Interleucina
IMC	Índice de masa corporal
LS	Líquido sinovial
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfocitos T
μl	Microlitros
mL	Mililitros
MMPs	Metaloproteasas de matriz extracelular
MRL	Reacción variada de linfocitos de memoria
MTX	Metotrexato
NaN <sub>3</sub>	Ácida de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NF-κB	Factores de Transcripción nuclear kappa-Beta
ng/ml	Nanogramos por mililitro
NK	Linfocitos asesinos naturales
Nm	Nanómetros
NOS	Óxido nítrico sintetasa
Ob-R	Receptor de leptina
OPD	Ortofenil-endiamina
PAD	Peptidil-Arginina Desaminase
PPAR <sub>γ</sub>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Proteína C Reactiva
PHA	Fitohemaglutinina
%	Porcentaje
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RFA	Reactantes de fase aguda
SSA	Amiloidosis secundaria
Rpm	Revoluciones por minuto

SNC	Sistema Nervioso Central
STAT	Activadores Transcripción y Transducción de señales
TAB	Tejido adiposo blanco
TNF	Factor de necrosis Tumoral- $\alpha$
VEGF	Factor de crecimiento de epitelio vascular
VIH	Virus de la inmunodeficiencia Humana
VSG	Velocidad de Sedimentación Globular

## RESUMEN

La Artritis Reumatoide es una enfermedad autoinmune e inflamatoria, que incrementa significativamente la morbilidad y que si no es tratada adecuadamente, posiblemente ocasionará discapacidad y deterioro en la calidad de vida del paciente. A pesar de que esta enfermedad se conoce desde hace muchos años, debido a su etiología multifactorial, es muy difícil poder precisar el conjunto de elementos necesarios para desencadenar el proceso autoinmune y/o su cronicidad. Por todo ello es de gran importancia aportar nuevo conocimiento orientado en la elucidación de los mecanismos que pudieran intervenir en el desarrollo de esta enfermedad. Por otro lado, estos últimos años, las moléculas producidas por el tejido adiposo, conocidos como adipocitocinas, parecen jugar un papel muy importante, no sólo en la regulación del metabolismo energético del individuo, sino que también en influir de manera significativa en el control de procesos patológicos inflamatorios. Dentro de ellas, las moléculas de leptina, adiponectina (Acrp30) y resistina, son una clara influencia en la regulación inmunológica, sin embargo, no se ha caracterizado de manera sistemática sus efectos comparativos sobre las células de sangre y, en particular, linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Asimismo, aunque se ha propuesto que los niveles circulantes de las adipocitocinas podrían jugar un efecto sobre el desarrollo y estado clínico de los pacientes con AR, no se conoce su asociación con citocinas pro-inflamatorias ni con la actividad clínica de pacientes mexicanos.

**Objetivos:** Caracterizar el efecto *in vitro* de las adipocitocinas sobre la respuesta celular (proliferación, activación, inducción de citocinas, diferenciación y muerte celular) en células mononucleares de sangre periférica de donadores y pacientes con Artritis Reumatoide, así como evaluar la asociación entre los niveles circulantes de adipocitocinas y la actividad clínica de pacientes con AR.

**Metodología:** Se emplearon pacientes con AR, de acuerdo con los criterios ACR/EULAR, 2010, que asistieron al Hospital General de Cuernavaca y se determinó la actividad clínica (DAS28). También se emplearon muestras

sanguíneas de donadores del CETS-Morelos. Las células mononucleares (CMN) derivadas de sangre periférica fueron aisladas por la técnica de Ficoll-Paque y el aislamiento de células T CD4<sup>+</sup> se realizó con perlas magnéticas. Los ensayos *in vitro* fueron realizados con leptina y Acrp30 humanas recombinantes. El efecto proliferativo y de activación fueron evaluados por la técnica de MTT y la expresión de los marcadores CD25 y CD69, se realizó por citometría de flujo. Los niveles de IL-2 y TNF $\alpha$  en los sobrenadantes de cultivo, así como los niveles de adipocitocinas en plasma (leptina, Acrp30 y resistina), fueron evaluados por ELISA. La resistencia a la apoptosis inducida por etopósido fue evaluada por Yoduro de Propidio. La expresión de STAT3 y ROR $\gamma$ T fue evaluada por la técnica de Western Blot. Se empleó estadística analítica, empleando medias y desviación estándar para la descripción. Para la comparación entre grupos se empleó la prueba de Mann-Whitney y para el análisis de correlación se empleó la prueba de Spearman, considerando una  $p < 0.05$  como significativa.

Resultados: Al evaluar la capacidad, por inducción de las adipocitocinas se logró observar un efecto proliferativo tanto en las células de donadores como de pacientes con AR y, en células derivadas del último grupo de individuos, se pudo observar una correlación estadística entre la actividad de la enfermedad y la proliferación inducida por leptina y Acrp30. Por otro lado, y de manera interesante, las CMN derivadas de los pacientes mostraron una respuesta mayor al ser incubadas con las adipocitocinas *in vitro*, ya sea en base a sus marcadores de activación (CD25, CD69, receptor de leptina, pSTAT3), así como la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 and TNF); en comparación con las CMN de los donadores. Adicionalmente, se observó que la secreción de IL-2 inducida por la incubación de leptina con CMN de pacientes correlacionó significativamente con la actividad clínica. Así también en los ensayos de muerte celular, se observó que la incubación con leptina o Acrp30 parecen “rescatar de la apoptosis” inducida por el tratamiento con etopósido. Por otro lado, y apoyo a nuestra propuesta de la existencia de una relación funcional entre leptina y el fenotipo Th17, observamos en



nuestro sistema *in vitro* que la incubación por leptina indujo la expresión de ROR $\gamma$ T en un cultivo de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, así como incremento en la secreción de las citocinas IL-6 e IL-17 al medio de cultivo. En nuestras condiciones, este efecto fue similar al efecto de inducir la diferenciación hacia el fenotipo Th17 inducido mediante un cocktail de citocinas y anticuerpos. Esto último parece sugerir, que la leptina podría jugar un papel multifuncional tanto en la activación, sobrevida y diferenciación hacia el fenotipo Th17 de las CMN y linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los pacientes con AR. Por otro lado, en un estudio de comparación, que incluyó 121 pacientes con AR y 90 donadores, se observó que los niveles circulantes de leptina y resistina fueron significativamente mayores en pacientes con AR de actividad clínica alta, en comparación de aquellos con baja actividad, así como con los donadores; relación que no fue observada para la adiponectina. Por su parte, después de un análisis de correlación se observó una asociación entre los niveles de leptina con la actividad clínica y los niveles de IL-1 $\beta$ . Mientras tanto, los niveles de resistina se correlacionaron positivamente sólo con la actividad clínica. En un aspecto muy diferente, los niveles de Acrp30 correlacionaron positivamente con los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , pero no con la actividad clínica de los pacientes. Finalmente, observamos una clara correlación entre los niveles de IL-6 e IL-17, y de ellos con la actividad clínica. Ajusta resaltar que las asociaciones observadas fueron independientes del Índice de masa corporal o estado de obesidad de los pacientes reclutados en el estudio.

Conclusiones: Las CMN y linfocitos CD4<sup>+</sup> derivadas de sangre periférica de pacientes con AR fueron significativamente más sensibles a la incubación con las adipocitocinas leptina y Acrp30. Asimismo, la respuesta a estas adipocitocinas parece correlacionar positivamente con la actividad clínica de los pacientes. Por otro lado, la leptina podría jugar un papel relevante para favorecer el fenotipo Th17 en linfocitos T. Finalmente, en un estudio transversal pudimos confirmar que los niveles circulantes de las adipocitocinas fueron mayores en los pacientes, en comparación con los donadores y que las concentraciones se correlacionaron positivamente con

la actividad clínica de los pacientes. Todo esto parece sugerir que los altos niveles de las adipocitocinas en la sangre de los pacientes con AR juegan un papel importante para explicar la alta reactividad celular, alta respuesta inflamatoria, sobrevivencia e incluso diferenciación de linfocitos T hacia el fenotipo Th17.

## ABSTRACT

Rheumatoid Arthritis is an autoimmune and inflammatory disease that significantly increases the risk of dying and, if it is not treated properly, leads to disability and deterioration in the patient's quality of life. Although this disease has been known for many years, due to its multifactorial etiology, it is very difficult to be able to specify the set of elements necessary to trigger the autoimmune process and/or its chronicity. Therefore, it is of great importance to provide new knowledge oriented to the elucidation of the mechanisms that could intervene in the development of this disease. On the other hand, in recent years, molecules derived from adipose tissue known as adipocytokines, seem to play a very important role not only in regulating the energy metabolism of the individual, but also significantly influence the control of pathological inflammatory processes. Among them, leptin, adiponectin (Acrp30) and resistin are molecules with a clear influence on immunological regulation; however, their comparative effects on blood cells and, in particular CD4 + T lymphocytes, have not been systematically characterized. Likewise, although it has been proposed that circulating levels of adipocytokines could play an effect on the development and clinical status of patients with RA, their association with pro-inflammatory cytokines and the clinical activity of Mexican patients is not known.

**Objectives:** To characterize the *in vitro* effect of adipocytokines on the cellular response (proliferation, activation, induction of cytokines, differentiation and cell death) in peripheral blood mononuclear cells of healthy donors and patients with Rheumatoid Arthritis as well as to evaluate the association between levels circulating adipocytokines and the clinical activity of patients with RA.

**Methodology:** Samples from patients with RA according to the ACR / EULAR 2010 criteria who attended the Hospital General de Cuernavaca were included and their clinical activity (DAS28) was determined. Blood samples from donors of the CETS-Morelos were also included. The mononuclear cells (CMN) derived from peripheral blood were isolated by the Ficoll-Paque technique and the isolation of

CD4 + T cells was performed with magnetic beads. The *in vitro* tests were performed with recombinant human leptin and Acrp30. Proliferative and activation effect were evaluated by the MTT technique and the expression of the markers CD25 and CD69, was performed by flow cytometry. The levels of IL-2 and TNF $\alpha$  in the culture supernatants, as well as the levels of adipocytokines in plasma (leptin, Acrp30 and resistin), were evaluated by ELISA. The resistance to apoptosis induced by etoposide was evaluated by YoPro / propidium iodide. The expression of STAT3 and ROR $\gamma$ T was evaluated by the Western Blot technique. Analytical statistics were used, using means and standard deviation for the description. For comparisons between groups, the Mann-Whitney test was used and for the correlation analysis the Spearman test was used, considering  $p < 0.05$  as significant.

Results: When evaluating the capacity, by induction through adipocytokines, a proliferative effect could be observed both in the donor cells and in patients with RA and in cells derived from the latter group of individuals a statistical correlation could be observed between the activity of the disease and the proliferation induced by leptin and Acrp30. On the other hand and interestingly, CMNs derived from patients showed a greater response when incubated with adipocytokines *in vitro*, either based on their activation markers (CD25, CD69, leptin receptor, pSTAT3), as well as on the secretion of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6 and TNF) compared to the MNCs of the donors. Additionally, it was observed that IL-2 secretion induced by the incubation of leptin with CMN from patients correlated significantly with clinical activity. Also, in cell death assays, it was observed that incubation with leptin or Acrp30 seem to "rescue from apoptosis" induced by treatment with etoposide. On the other hand, and in support of our proposal of the existence of a functional relationship between leptin and the Th17 phenotype, we observed in our *in vitro* system that incubation with leptin induced the expression of ROR $\gamma$ T in a culture of CD4 + T lymphocytes, as well as an increase in the secretion of IL-6 and IL-17 to the culture medium. In our conditions, this effect was similar to the effect of inducing differentiation towards the Th17 phenotype induced by a

cocktail of cytokines and antibodies. The latter seems to suggest that leptin could play a multifunctional role in both the activation, survival and differentiation towards a Th17 phenotype on CMN and lymphocytes.

# **1 INTRODUCCIÓN**

## **1.1 ARTRITIS REUMATOIDE**

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, crónico-degenerativa, sistémica e inflamatoria, con una prevalencia a nivel mundial del 1% y que puede progresar hacia la discapacidad en una proporción considerable de los casos, sobre todo cuando el paciente no recibe un tratamiento modificador de la enfermedad (McInnes and Schett 2011, Smolen et al. 2016).

La AR es una artropatía inflamatoria muy común, siendo más frecuente en mujeres que en hombres; en una relación 3:1, aunque esta relación puede ser mucho mayor. En nuestro país la edad promedio de presentación oscila entre los 35 y 50 años, población que se considera económicamente activa. (Myasoedova, 2010).

A nivel clínico, la AR se caracteriza por la hiperproliferación sinovial que conduce a un cuadro clínico caracterizado por artritis de articulaciones periféricas, dolor y pérdida de la función. La inflamación crónica en AR conlleva a la erosión del cartílago y daño al hueso subyacente, que ocurre secundariamente a la proliferación sinovial, con la consecuente deformidad progresiva de las articulaciones y la reducción de la movilidad articular; lo cual genera distintos grados de incapacidad funcional y morbilidad.

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, disminución significativa en el estado funcional y el incremento en la morbilidad y mortalidad del paciente. Asimismo, cada vez es más aceptado considerar que la AR es un proceso patológico muy heterogéneo, donde no sólo participan las características propias del paciente y el tratamiento farmacológico, sino que puede reflejar la contribución de los diferentes factores etiológicos.

### **1.1.1 Etiología**

La etiología de la AR, por definición, es desconocida, pero existe amplia evidencia de que su desarrollo es resultado de la interacción de diferentes factores tanto genéticos,

medioambientales e inmunológicos. Presumiblemente, una de las causas por la cual es más frecuente en mujeres que en hombres podría deberse al efecto que tienen algunas hormonas (como los estrógenos) sobre el sistema inmunológico (Smolen et al. 2016). Adicionalmente, algunos estudios han descrito que pacientes con AR durante el embarazo, han tenido una mejora en la sintomatología de la enfermedad, por lo que se considera que la participación de las hormonas sexuales puede ser un factor crucial en la evolución de la misma (Soory, 2002).

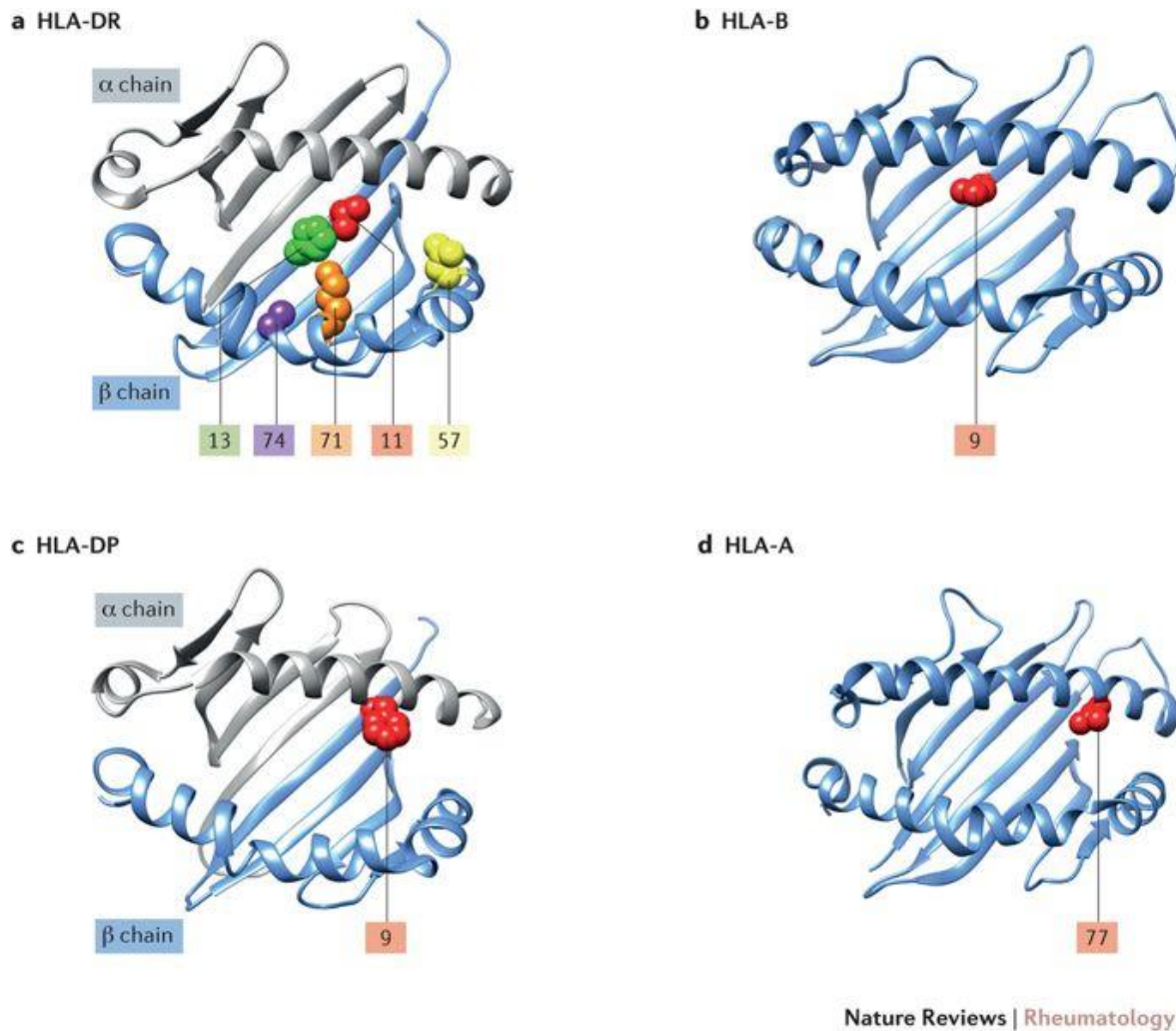
La influencia genética ha sido ampliamente descrita en esta patología, sin embargo, este factor también es muy variable, llevando a considerar como factores de riesgo a alteraciones en más de 100 genes para el desarrollo de la AR (Okada, 2014).

Por otro lado, quizás, los factores de riesgo genéticos mejor caracterizados son las variantes genéticas asociadas al complejo mayor de histocompatibilidad. (MHC) las que representan la mayor relación de heredabilidad genética de AR. (>60%) (Okada, 2014, Lenz, 2015)

La región 6p21.3 en el cromosoma 6, se caracteriza por ser una secuencia extremadamente densa y diversa. Contiene más de 252 genes funcionales que codifican moléculas tales como HLAs, factores del complemento, citocinas y otras proteínas involucradas en el procesamiento de antígenos.

La fuerte asociación con la AR en la región MHC se explicó inicialmente por la hipótesis de "epítipo compartido" que sugiere que hay un incremento en el riesgo a desarrollar AR con los alelos HLA-DRB1 en secuencias consenso de aminoácidos (QRRAA, RRRAA y QKRAA) de las posiciones 70 a 74, correspondiente a la tercera región hipervariable de la cadena HLA-DRβ1. (Gregersen. 1987). Esto ha sugerido que ciertas secuencias, localizadas en el surco de la molécula del MHC II, son más permisibles para presentar antígenos del propio hospedero, sobre todo relacionadas con las proteínas modificadas por citrulinación, llevando en la generación de una respuesta autoinmune de memoria. De esa manera, los alelos del epítipo compartido HLADRB1 (incluidos \*04:01, \*04:04, \*04:05, \*04:08, \*10:01, \*01:01 y \*01:02) se asocian estadísticamente con un aumento de susceptibilidad a la AR. Además, se ha establecido que el alelo del epítipo no compartido HLADRB1 \*09:01, con la secuencia de

aminoácidos RRRAE en las posiciones 70 a 74, como un alelo de riesgo de AR en poblaciones africanas y asiáticas. (Reynolds, 2014, Shimane, 2013) (Figura 1).

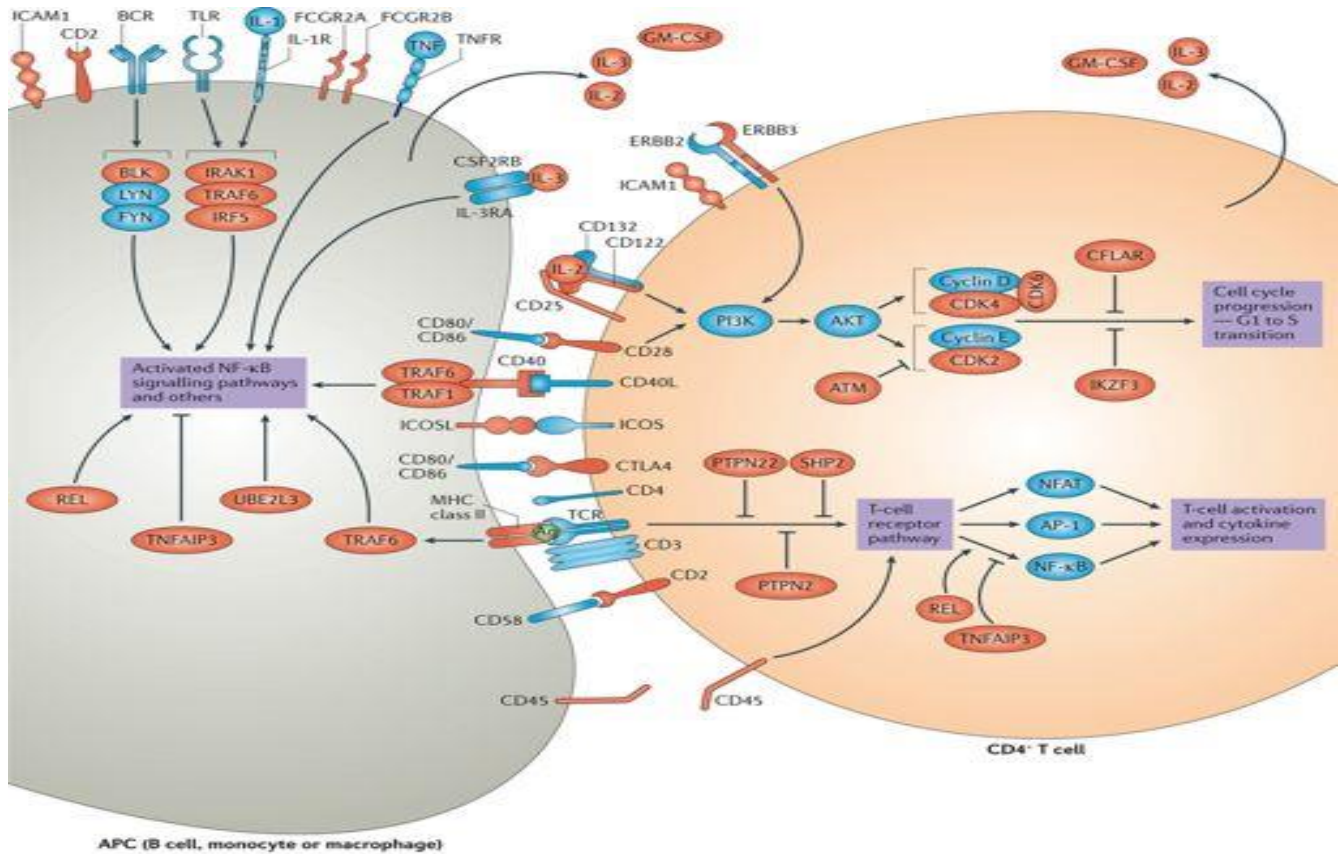


**Figura 1. Ubicación de variantes HLA asociadas a riesgo de desarrollo de AR y proteínas anticuerpo citrulinado.** En el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) se han identificado las posiciones de a) HLA-DR $\beta$ 1 11 (o 13), 71 (o 57) y 74; b) HLA-B aa posición 9; c) HLA-DP $\beta$ 1 aa posición 9 del aminoácido y c) HLA-A aa posición 77 para ser asociado con proteínas anticuerpo citrulinado y autoanticuerpos AR positivo. Kim K, Bang SY, Lee HS, Bae SC. Update on the genetic architecture of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2017 Jan;13(1):13-24.

Además de los genes de susceptibilidad en el HLA, también se han encontrado asociación con el desarrollo de la AR de diversos polimorfismos de moléculas relacionadas con el control del sistema inmune, entre estas se encuentran: las fosfatasas de tirosina PTPN22 y



PTPN6, que se encargan de la activación de motivos de tirosina mediados por el Receptor de Linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) y el antagonista de NF-κB conocido como TNFAIP3; entre otros (Morgan A et al. (2009); Elsby L et al. (2010); Alrayes H et al (2011); Qidwai T and Khan F. (2011)). (Figura 2)



Gene abbreviation	Protein	Protein
ATM	Serine-protein kinase ATM	ATM
BLK	Tyrosine-protein kinase Blk	BLK
CD2	T-cell surface antigen CD2	CD2
IL2RA	IL-2 receptor subunit α	CD25
CD28	T-cell-specific surface glycoprotein CD28	CD28
CD40	TNF receptor superfamily member 5	CD40
PTPNC	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C	CD45
IL2RB	IL-2 receptor subunit β	CD122
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	CDK2
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	CDK4
CDK6	Cyclin-dependent kinase 6	CDK6
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CFLAR
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte protein 4	CTLA4
ERBB3	Receptor tyrosine-protein kinase erbB3	ERBB3
FCGR2A	Low affinity IgG Fc region receptor 2A	FCGR2A
FCGR2B	Low affinity IgG Fc region receptor 2B	FCGR2B

Gene abbreviation	Protein	Protein
CSF2	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	GM-CSF
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	ICAM1
ICOSLG	ICOS ligand	ICOSL
IKZF3	Zinc finger protein Aiolos	IKZF3
IL2	Interleukin-2	IL-2
IL3	Interleukin-3	IL-3
IRAK1	IL-1 receptor-associated kinase 1	IRAK1
IRF5	IFN regulatory factor 5	IRF5
PTPN2	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 2	PTPN2
PTPN22	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22	PTPN22
REL	Proto-oncogene c-Rel	REL
PTPN11	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11	SHP2
TNFAIP3	TNF α-induced protein 3	TNFAIP3
TRAF1	TNF receptor-associated factor 1	TRAF1
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	TRAF6
UBE2L3	Ubiquitin-conjugating enzyme E2L3	UBE2L3

Nature Reviews | Rheumatology

**Figura 2. Vías de señalización relacionadas con la presentación de antígenos y regiones de susceptibilidad al desarrollo de AR.** 35 locus que son factores de riesgo para AR. Los productos del gen (rojo) se asignan a vías de señalización simplificadas en células T y APCs. Se muestran los productos genicos de vías de señalización en células T y APC, y su interacción. Kim K, Bang SY, Lee HS, Bae SC. Update on the genetic architecture of rheumatoid arthritis. Nat Rev Rheumatol. 2017 Jan;13(1):13-24

Uno de los polimorfismos asociados con esta enfermedad es el gen que codifica para la citocina TNF, la cual tiene acciones pro-inflamatorias y es empleada de manera frecuentemente para amplificar la respuesta contra diferentes agentes infecciosos; aunque puede ser secretada por diferentes tipos celulares. En estudios recientes, se han observado niveles altos de esta citocina en pacientes portadores del polimorfismo rs1800629 (Li, 2014). Dada la fuerte asociación que existe entre la fisiopatología y el TNF, esta citocina se seleccionó como un blanco terapéutico en la progresión sintomática y la gravedad de la enfermedad, a partir de lo cual se han desarrollado varios medicamentos biotecnológicos específicos, de gran eficacia y adecuada seguridad para los pacientes (Bongartz, T. 2006). Otros polimorfismos relevantes que no se encuentran asociados a HLA son: *IL23R*, *TRAF1*, *CTLA4*, *IRF5*, *STAT4*, *CCR6*, *PADI4* (Kim et al. 2017). Debido a que los factores genéticos sólo permiten tener una explicación parcial del desarrollo de la AR, se ha sugerido la participación de otros factores, tales como los ambientales, entre los que se pueden destacar: la exposición de irritantes crónicos como los componentes del tabaco, sílices, asbestos, entre otros (Ruiz-Esquide V y Sanmartí R., 2012). Entre estos, la exposición al humo del tabaco se ha relacionado fuertemente con esta enfermedad, ya que induce un proceso inflamatorio pulmonar, caracterizado por la activación de macrófagos y neutrófilos, los cuales son capaces de secretar citocinas tales como IL-6, MIF, TNF, IL-2, GM-CSF, permitiendo amplificar la respuesta inflamatoria local y estimulando la activación de la inmunidad tanto humoral como celular (McInnes L and Schett, I. 2007). Adicionalmente, la exposición al humo de tabaco estimula la expresión y activación enzimática de la proteína PAD4, lo cual ocasionaría un incremento en la citrulinación (desaminación de residuos de arginina) de proteínas séricas o de matriz extracelular presentes en el pulmón (Rojas-Serrano J et al, 2011; Lundstrom E *et al.*, 2009; Makrygiannakis D et al., 2008). Se ha sugerido que las proteínas citrulinadas podrían ser endocitadas y procesadas por las células presentadoras de antígeno (APC; por sus siglas en inglés), para ser presentados en el contexto del HLA de tipo II a las poblaciones de linfocitos T y B auto reactivas; todo lo cual llevaría a la generación de una respuesta inmune específica en contra de antígenos citrulinados y, por tanto, favoreciendo una respuesta autoinmune. En este sentido, la presencia de anticuerpos anti-péptidos citrulinados cíclicos ( $\alpha$ CCP), como marcador característico de los pacientes con AR,

constituye una evidencia de la importancia de la actividad enzimática de la PAD4 en este proceso autoinmune. Así mismo, los niveles de  $\alpha$ CCP constituyen uno de los biomarcadores más específicos y tempranos para el diagnóstico de la AR (Chirivi R, Jenniskens G and Raats J., 2013; Kolfenbach J. 2010; Kinloch A et al. 2008; Hinks A et al., 2005).

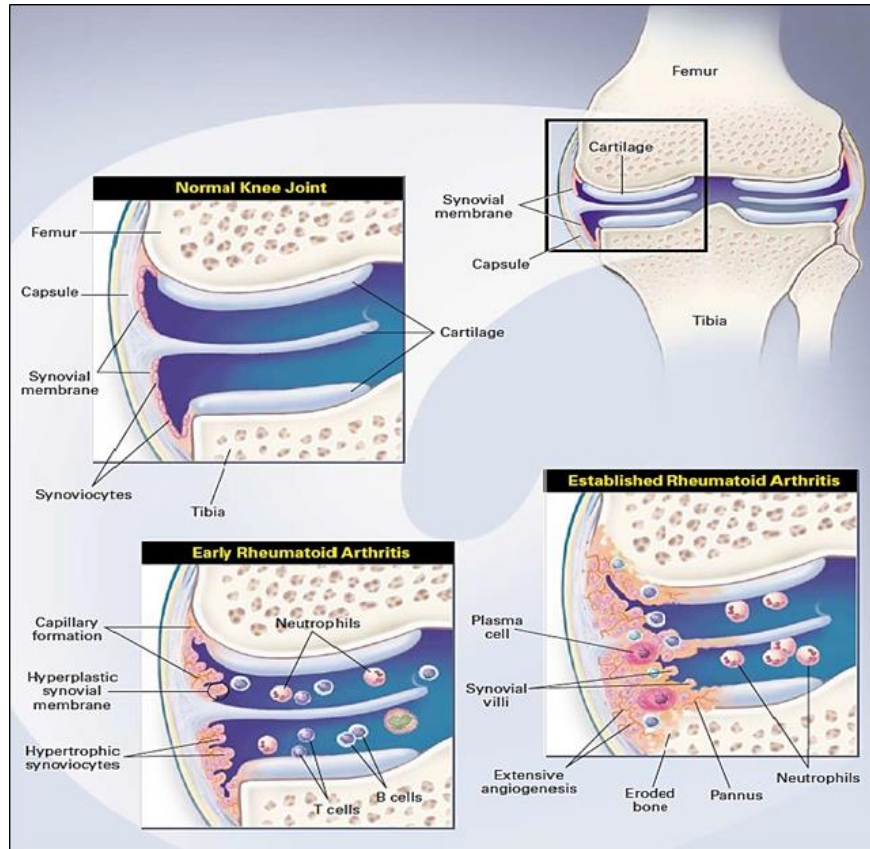
Otros factores ambientales relacionados con la AR incluyen infecciones ocasionadas por virus y bacterias a los cuales el individuo se encuentra expuesto. Tanto es el caso, que se ha propuesto un mecanismo hipotético (mimetismo molecular), en la cual se destacan microorganismos como micobacterias, mycoplasma, virus del Epstein-Barr, parvovirus B19, rubeola y retrovirus, los cuales tendrían la capacidad de causar mimetismo, esto significa, que estos microorganismos tienen proteínas que son parecidas a algunas que existen en nuestro organismo y cuando el individuo se expone a estas bacterias o virus, su memoria inmunológica podría provocar errores con sus propias proteínas, por ejemplo proteínas de la matriz extracelular del espacio sinovial con aquellas presentes en los microorganismo infecciosos y se originara una respuesta autoinmune (Bellucci et al. 2016, Klareskog et al. 2006).

Adicionalmente, en las últimas décadas se han evidenciado que las infecciones periodontales podrían considerarse como factor preponderante en el desarrollo de AR. Un reciente estudio en “microbioma oral” de pacientes con AR, identificó que *A. actinomycetemcomitans* es capaz de hipercitrulinar proteínas a través de la leucotoxina (Itxa), mecanismo mediado en neutrófilos, ofreciendo así evidencias de la denominada “teoría de los gérmenes” la cual sugiere que los patógenos orales pueden desencadenar la producción de autoanticuerpos específicos de la enfermedad en individuos susceptibles (Konig et al 2016). Así también se pueden mencionar las ocasionadas por *Porphyromona gingivalis*, o *Tannerella forsythia*, estas favorecen la citrulinación o carbamilación de proteínas, favoreciendo así una interacción importante que condiciona la inflamación articular característica de la enfermedad. (Hernández-Aguas J, et al. 2017, Martínez-Rivera, J.I. et al. 2017).

### 1.1.2 Fisiopatología

Como se observa en la Figura 3, el desarrollo de la AR sigue una serie de etapas antes de la presentación de manifestaciones clínicas en el paciente. En un principio, se sugiere que ocurre una serie de alteraciones en la respuesta inmune que llevan a la generación de una respuesta autoinmune (Etapa Pre-articular), caracterizada por la generación de auto-anticuerpos o selección de células auto-reactivas, pero que es asintomática y se ha sugerido que puede variar entre 1 y 10 años. Posteriormente, se asume que el desarrollo de la AR continúa con una fase transitoria, caracterizada por el desencadenamiento de un proceso inflamatorio, ya sea local o sistémico, que favorece la activación de la respuesta autoinmune que hasta el momento se ha mantenido “silente”. En esta etapa, tienen un papel activo los factores ambientales e inmunológicos para poder desencadenar las manifestaciones clínicas de la enfermedad. A continuación, de no modificarse tempranamente el curso de la enfermedad, el paciente desarrollaría los síntomas inflamatorios, estructurales e incapacitantes característicos de la enfermedad (Fase Articular).

La membrana sinovial es un tejido vascularizado que recubre la parte interna de las articulaciones, manteniendo una presión negativa y asegurando la síntesis de fluidos lubricantes en el espacio articular. Las capas externas de la cápsula articular están recubiertas por una colección densa de fibras de colágeno. Asimismo, en el espacio articular, se localizan algunas células adiposas y, finalmente, recubriendo el interior del espacio articular, se localiza la membrana sinovial (Figura 4). Esta membrana está constituida por dos tipos celulares característicos: los sinoviocitos de tipo A y de tipo B, siendo las células del primer tipo las que presentan funciones fagocíticas, además de interactuar con las células presentadoras de antígenos (Choy H.S. Ernest and Panay Gabriel, 2001). Los sinoviocitos de tipo B presentan morfología fibroblástica y son los principales productores del ácido hialurónico, el principal componente del líquido sinovial, y del intercambio de líquidos entre la sangre y la membrana sinovial.

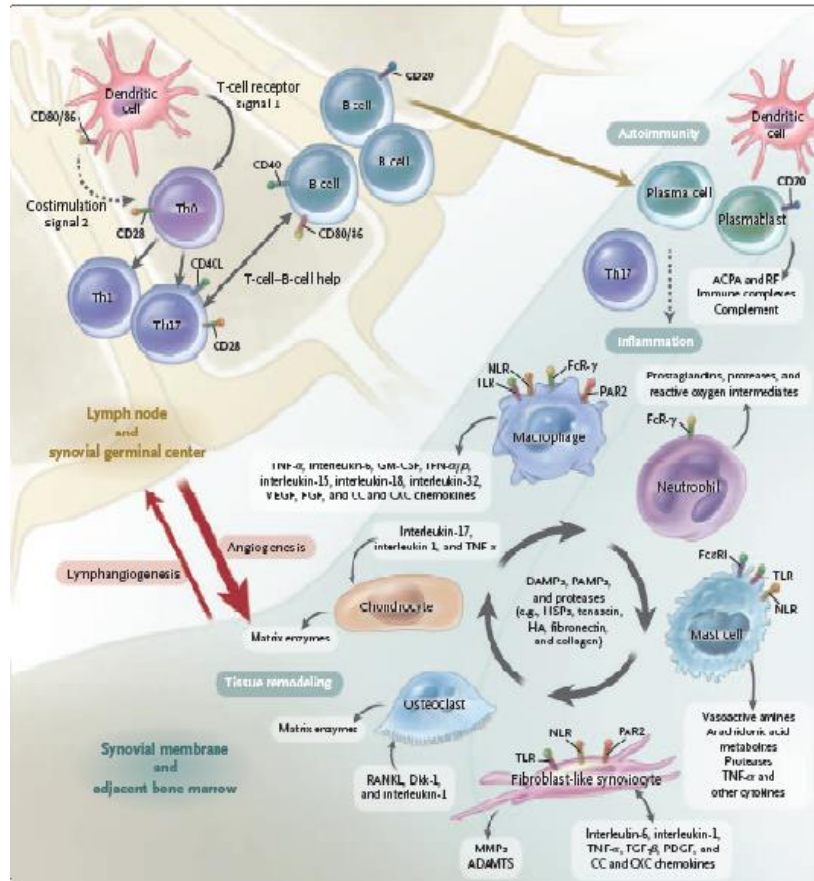


**Figura 3. Fisiopatogénesis de la Artritis Reumatoide.** Los linfocitos T juegan un papel clave en la evolución de la enfermedad coordinando la respuesta inflamatoria, infiltración leucocitaria, la tolerancia inmunológica y la destrucción de cartílago y hueso. Choy H.S. Ernest and Panay Gabriel. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. N Engl J Med 2001 Mar 22;344(12): 907-916

Dentro del aspecto fisiopatológico (Figura 3), durante las fases iniciales de la enfermedad, se aprecia una hiperplasia de la membrana sinovial que compromete la capa de revestimiento conectivo generando una señal de daño, que eventualmente producirá un infiltrado celular inflamatorio (Visser, 2005).

Posteriormente y, como consecuencia de la infiltración de células activadas, se incrementará la hiperplasia (generación de tejido conocido como *Pannus*) y la angiogénesis. A continuación, se iniciará la destrucción de cartílago y hueso, eventos que están mediados por dos componentes: las metaloproteasas de matriz y los osteoclastos, respectivamente. Asimismo, es característico de la inflamación articular, el ambiente hipóxico, la estimulación de

la muerte celular y la angiogénesis, los cuales favorecen la infiltración de células inmune efectoras (Choy H.S. Ernest and Panay Gabriel, 2001).



**Figura 4. Procesos inmunológicos adaptativos e innatos dentro de la articulación afectada por artritis reumatoide.** Las interacciones dependientes de la coestimulación entre células dendríticas, células T y células B se muestran como ocurriendo principalmente en el nodo linfático; esto genera una respuesta autoinmune a proteínas que contienen citrulina. En la membrana sinovial y médula ósea adyacente, las señales de la respuesta inmune adaptativa e innata se integran para promover la remodelación y el daño de los tejidos. Esta retroalimentación positiva mediada por las interacciones mostradas entre los leucocitos, fibroblastos sinoviales, condrocitos y los osteoclastos, junto con moléculas producidas por el daño, conducen la fase crónica en la patogénesis de AR. ADAMTS: denota una desintegrina y metaloproteasa con dominios similares a trombospondina-1; DAMP parones moleculares asociados a daño; Dkk-1 dickkopf-1; FcR Fc receptor; FcεRI receptor de IgE de alta afinidad; FGF factor de crecimiento de fibroblastos; GM-CSF factor estimulante de colonias granulocito-macrófago; HA hialuronano; HSP proteína de choque térmico; IFN-α/β interferón-α/β; MMP metaloproteinasas de matriz; NLR: Dominio de oligomerización unión a nucleótidos; PAMP patrón molecular asociado a patógeno; PAR2 proteasa activada por receptor; PDGF factor de crecimiento derivado de plaquetas; RANKL receptor activado por el ligando del factor nuclear κB; TGF-β factor de crecimiento transformante β; Th0 células T helper tipo 0; Th1 células T helper tipo 1; Th17 células T helper tipo 17; TLR , receptor tipo toll; TNF-α factor de necrosis tumoral y VEGF factor de crecimiento endotelial vascular Iain B. McInnes, F.R.C.P., Ph.D., and Georg Schett, M.D. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis, N Engl J Med 2011;365:2205-19, 2011



Todas las fases de la fisiopatología son reguladas por la comunicación entre células de la membrana sinovial y los diferentes tipos de células infiltradas, como se puede observar en la Figura 4. Así se ha propuesto a la fase inicial o autoinmune como esencial para el desencadenamiento de la AR, donde las células presentadoras de antígeno captan antígenos propios que son presentados en el contexto del MHC-II a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. En este punto se propone que los mecanismos de mimetismo molecular con “antígenos extraños” y la citrulinación de proteínas pudieran desencadenar la producción de autoanticuerpos por activación de las células plasmáticas (linfocitos B en la Figura 4), lo que permitiría la formación de inmunocomplejos a nivel sinovial ya que es una fuente importante de antígenos. Por su parte, la respuesta autoinmune es mediada por células “autorreactivas” cuando son linfocitos T citotóxicos (CD8) quienes son activados y seleccionados para reconocer los antígenos presentes en la articulación (Rommel C. Campos. 2007).

Se sugiere que la presencia de complejos antígeno-anticuerpos en el espacio sinovial lleva a la generación de factores quimiotácticos, los cuales favorecen la infiltración y la activación de células del sistema inmune innato tales como macrófagos, neutrófilos y monocitos. Posteriormente, y dependiente de diferentes eventos de activación celular, se estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos, la hiperproliferación celular y la activación de metaloproteasas y osteoclastos. Finalmente, la destrucción selectiva de las estructuras sinoviales (matrix extracelular, cartílago y hueso) es consecuencia de la expresión de metaloproteasas de matriz (MMP) derivadas de los sinoviocitos tipo fibroblasto, así como por efectos de la activación de los osteoclastos, responsables de la destrucción ósea (Rommel C, Camps M and Ji H., 2007).

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 I. De esa manera, las citocinas son proteínas de bajo peso molecular que tienen receptores en varios tipos celulares del sistema inmune e incluso en células que no son del sistema inmune. 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 hacia el espacio sinovial, sino que ocasionarán su activación y proliferación (McInnes L and Schett, I., 2007).

Con el objetivo de dar una visión general sobre la participación de las citocinas sobre el desarrollo de la AR, la Tabla I ofrece una relación de las principales moléculas involucradas con esta enfermedad.

**Tabla 1.** Principales Citocinas implicadas durante la AR.

CITOCINA	EXPRESIÓN EN LA ARTICULACIÓN	FUNCIÓN POTENCIAL EN LA PATOGENESIS
<b>IL-1<math>\alpha</math> y/o IL-1<math>\beta</math></b>	Monocitos, células B, fibroblastos sinoviales, condrocitos	↑ Citocinas de fibroblastos sinoviales, quimiocinas, MMP, iNOS y liberación de PG; ↑citocinas monocíticas, activación de osteoclastos; ↓síntesis GAG, ↑iNOS, MMP y agrecanasa; expresión de la molécula de adhesión endotelial
<b>IL-18</b>	Monocitos, PMNs, Células dendríticas (CDs), plaquetas, células endoteliales	Diferenciación de células T (células Th1 con IL-12; células Th2 con IL-4); activación de células NK, liberación de citocinas, ↓síntesis de GAG de condrocitos, expresión de iNOS, liberación de citocinas por monocitos y la expresión de la molécula de adhesión, activación de PMN liberación de citocinas y migración.
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Monocitos, células T y B, células NK, PMNs, células cebadas, fibroblastos sinoviales y osteoblastos	↑ Activación de monocitos, liberación de citocinas y PG; ↑priming PMN, apoptosis y estallido oxidativo; apoptosis de células T, regulación clonal y disfunción del TCR; ↑expresión de la molécula de adhesión endotelial, liberación de citocinas; ↓ proliferación de fibroblastos sinoviales y síntesis de colágeno, ↑MMP y liberación de citocinas; ↑ liberación de ácidos grasos desde adipocitos, efectos endocrinos.
<b>LT<math>\alpha</math> y/o LT<math>\beta</math></b>	Células T, monocitos fibroblastos sinoviales.	Desarrollo de órgano linfoide periférico; tiene bioactividades similares a TNF.
<b>RANKL</b>	Células del estroma, osteoblastos, células T.	Estimula la reabsorción en el hueso por la vía de la maduración y activación de osteoclastos; modulación de las interacciones entre células T y CD
<b>BAFF</b>	Monocitos, células T, CDs	Proliferación de células B, secreción de anticuerpos, cambio de isotipo y sobrevivencia; co-estimulación de células.
<b>APRIL</b>	Monocitos, células T	Proliferación de células B
<b>IL-17<sup>a</sup></b>	Células Th17, fibroblastos sinoviales	↑□citocinas de fibroblastos sinoviales y liberación de MMP; osteoclasgénesis; hematopoyesis; ↓ síntesis de GAG por condrocitos; ↑producción de citocinas por leucocitos
<b>IL-12</b>	Macrófagos, CDs	Maduración y proliferación de células Th1; citotoxicidad de células T y NK; activación de células B.
<b>IL-23</b>	Macrófagos, CDs	Proliferación de células Th17
<b>IL-7</b>	Fibroblastos sinoviales monocitos?	Expansión y sobrevivencia de células T; activación de macrófagos; regulación hematopoyética; regulación tímica; maduración de células NK.



<b>IL-15</b>	Monocitos, células B, células cebadas, fibroblastos sinoviales, PMNs y CDs	Quimioquinesis de células, activación y mantenimiento de memoria; diferenciación de células B y cambio de isotipo; activación de células NK y citotoxicidad, activación de fibroblastos sinoviales; activación/supresión macrófago (dosis dependiente); activación de PMN expresión de la molécula de adhesión y estallido oxidativo.
<b>L-10</b>	Monocitos, células T y B, CDs, células epiteliales	↑ Liberación de citocinas del macrófago, iNOS y expresión del receptor soluble, ↓ ROI; liberación de citocinas de las células T; ↓ expresión MHC, inducción de anergia, maduración y función efectora (?) de células TReg; ↓ activación y liberación de citocinas en CD; ↓ liberación de colágeno y MMP en fibroblastos sinoviales; ↑ cambio de isotipo en células B
<b>IL-6</b>	Monocitos, fibroblastos sinoviales, células B y T	Proliferación y producción de anticuerpos de células B; hematopoyesis y trombopoyesis; proliferación diferenciación y citotoxicidad de células T; ↑ respuesta hepática de fase aguda; ↑ efectos neuroendocrinos
<b>Oncostatina M</b>	Monocitos y células T activadas	Diferenciación del megacariocito; ↑ liberación de TIMP y citocinas en fibroblastos sinoviales, ↑ reactivos en fase aguda, ↑ inhibidores de proteasas; ↓ liberación de TNF en monocitos, ↓ función efectora de IL-1; ↑ efectos neuroendocrinos y liberación de corticosteroides; modulación de osteoclastos (?)
<b>TGFβ</b>	Fibroblastos sinoviales, monocitos, células T, plaquetas	Reparación de heridas, mantenimiento de la matriz y fibrosis; proliferación de células TH17 y TReg; ↓ proliferación y función efectora de células NK; activación inicial y posterior supresión de la respuesta inflamatoria; ↑ quimioatrayente de leucocitos en fase temprana, expresión de gelatinasa e integrina; activación temprana y supresión posterior de macrófagos; ↓ expresión iNOS
<b>Familia BMP (BMP2–BMP15)</b>	Células epiteliales, fibroblastos sinoviales, tejidos mesenquimales embrionarios	Regula la quimiotaxis, mitosis y los procesos de diferenciación durante la condrogénesis y osteogénesis; morfogénesis del tejido
<b>PDGF</b>	Plaquetas, macrófagos, células endoteliales, Fibroblastos sinoviales	Factor de crecimiento paracrino y/o autocrino para varias líneas; reparación
<b>Familia FGF</b>	Fibroblastos sinoviales, Monocitos	Crecimiento y diferenciación del mesenquima, epitelio y células neuroectodérmicas
<b>VEGF</b>	Monocitos, células endoteliales, fibroblastos Sinoviales	Angiogénesis
<b>IL-32</b>	Células epiteliales, monocitos, fibroblastos sinoviales	Liberación de citocinas, PG y MMP de macrófagos
<b>MIF</b>	Macrófagos, células T activadas, fibroblastos sinoviales	↑ Fagocitosis del macrófago, liberación de citocinas y NO; activación de células T, DTH; proliferación de fibroblastos, Expresión de COX, expresión de PLA2 y actividad oxidoreductasa
<b>IFNs Tipo I</b>	Amplia expression	efectos inmunomoduladores; ↑ expresión MHC; activación de macrófagos; activación, diferenciación, sobrevivencia (antiproliferativo) y alteraciones del citoesqueleto de linfocitos (antiproliferativo)

Se reconoce que las manifestaciones clínicas de la AR coinciden con la activación e infiltración de los leucocitos hacia el líquido sinovial. Entre estos, los linfocitos reclutados en el

líquido sinovial producen citocinas que amplifican la respuesta inflamatoria, al tiempo de estimular el reclutamiento de otras células inmunológicamente activas hacia la articulación, activando las células residentes y, favoreciendo la producción del líquido sinovial (McInnes L and Schett, I. 2011). En los procesos inflamatorios agudos, la migración leucocitaria se inicia con la expresión de moléculas de adhesión (L-selectina, ICAM-1) sobre la superficie de los linfocitos. Esta adhesión es débil y permite que las células “rueden” sobre la superficie de las células endoteliales de los vasos sanguíneos. La expresión de nuevas proteínas de adhesión permite una unión más firme y estable. A continuación, los leucocitos se deforman y migran entre las uniones de las células endoteliales (diapédesis), para posteriormente alcanzar los tejidos o, en este caso, la membrana sinovial (ver Figura 5). Después de su llegada al tejido sinovial, estas células pueden interactuar con los sinoviocitos de tipo A (macrófagos), induciendo su activación y proliferación. Como consecuencia de esta interacción, se activan las células T y se estimula la producción de citocinas pro-inflamatorias. Las citocinas, a su vez, contribuyen a la extravasación de los leucocitos, al alterar la expresión de las moléculas de adhesión. Numerosas citocinas regulan la adhesión celular, incluyendo la interleucina-1 $\beta$  y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), dos citocinas abundantes en pacientes con AR (McInnes L and Schett, I. 2007).

Por su parte, las células T CD4<sup>+</sup>, dependiendo del microambiente de citocinas van a diferenciarse en fenotipos específicos, siendo los más reconocidos: a) los linfocitos T colaboradores tipo 1 (Th1), que se caracterizan por producir una serie de citocinas pro-inflamatorias, tales como IL-2, interferón gama y TNF- $\alpha$ , que median las respuestas celulares; mientras que b) los linfocitos Th2, producen citocinas (IL-4, IL-6, IL-10) y vinculadas con la diferenciación y activación de los linfocitos B (inmunidad humoral), c) los linfocitos Th17, que requieren de TGF- $\beta$  e IL-6 para su diferenciación y que se caracterizan por la producción de IL-17 y, d) los Treg (CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/FoxP3<sup>+</sup>). En la fase temprana de la AR, se observa una clásica respuesta de tipo Th1; sin embargo, en una fase crónica, concurren mecanismos tanto humorales como celulares (Cooles & Isaacs, 2011).

Durante la inflamación, el endotelio emite señales que estimula la migración de los leucocitos. En la circulación normal, los leucocitos circulan suspendidos en el plasma sanguíneo

en un flujo sin contacto directo con la superficie endotelial de los vasos. Sin embargo, cuando ocurre un daño en los tejidos, se liberan diversos mensajes químicos, entre las cuales las citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) favorecen la generación de modificaciones en las propiedades adhesivas de la célula endotelial, lo cual permite la migración de los leucocitos al sitio de la lesión. La dilatación local de las vénulas induce la marginación de los leucocitos que se desplazan arrastrados por la circulación “rodando” sobre el endotelio. Este proceso, que suele denominarse “rolling”, es favorecido por la presencia de las proteínas de adhesión que conduce a una cascada de adhesión de muchos pasos (Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2005). (Ver Figura 5)

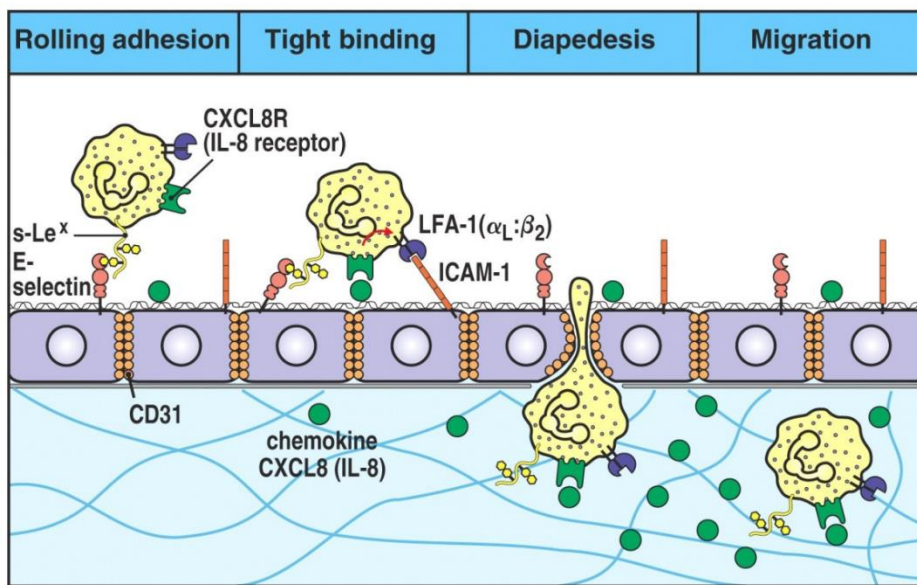


Figure 2-44 part 3 of 3 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

**Figura 5. Extravasación de leucocitos hacia el foco de inflamación.** La extravasación de leucocitos consiste en una serie de pasos altamente regulados: primero, debe reconocer el endotelio inflamado; posteriormente debe adherirse fuertemente de modo que no sea removido por el flujo sanguíneo; y mientras esta adherido a la pared del epitelio, debe penetrar la capa endotelial y acceder al tejido subyacente. La extravasación de neutrófilos puede dividirse en cuatro pasos: a) rodamiento, b) activación por estímulo quimioatrayente, c) diapédesis y d) migración endotelial. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2005. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. New York, New York: Garland Science Publishing. p. 23, 80-84.

Si en esta roda a lo largo de la pared del vaso, los receptores de los leucocitos captan la señal de una sustancia quimiotáctica, se activan induciendo un aumento en la expresión de proteínas de adhesión de los leucocitos, llamadas integrinas, como son LFA-1 y MAC1 que se

fijan firmemente a sus ligandos en el endotelio como ICAM-1. Esto ocasiona que las células se detengan sobre el endotelio (Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2005).

Los factores quimiotácticos o quimiocinas son moléculas solubles que se difunden pasivamente desde su sitio de producción. Su interacción con los receptores específicos en la membrana de los leucocitos provoca cambios en la expresión de las moléculas de adhesión, favoreciendo la migración orientada de células inmunes en favor de su gradiente de concentración creciente (Janeway C et al, 2005).

Una vez adheridos a la superficie endotelial, siguiendo las señales direccionales proporcionadas por los factores quimiotácticos y usando las integrinas para su fijación y tracción, los leucocitos se desplazan a través de los capilares y vénulas, extendiendo pseudópodos a través de las uniones intercelulares del endotelio vascular (diapédesis). Finalmente cruzan la membrana basal ingresando al intersticio y concentrándose en esa zona (infiltración leucocitaria) (Figura 6). Se reconoce que la inflamación sinovial generada por la artritis involucra una gran cantidad de quimiocinas. Por ejemplo, quimiocinas tales como CCL2, CCL5 CCL21 y CXCL13 contribuyen a la infiltración de linfocitos T en la sinovial. Otras quimiocinas participan a su vez en el reclutamiento de otros leucocitos, la diapédesis y su retención en del tejido inflamado o también llamado "homing". En todas estas actividades, las quimiocinas funcionan junto con las citocinas, las cuales regulan tanto su expresión como la de sus receptores. La expresión de quimiocinas y su importancia funcional en la AR ha llevado al desarrollo de propuestas terapéutica donde constituyen los blancos terapéuticos, aunque no se ha logrado un éxito clínico hasta ahora (Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2005).

Por otro lado, los neutrófilos son las células predominantes en el fluido sinovial de los pacientes con AR. En condiciones de inflamación aguda por infección, los neutrófilos son grandes productores de radicales libres del oxígeno, lo cual ayuda a eliminar a los microorganismos. En el caso de la AR, se han encontrado niveles elevados de radicales libres de oxígeno, posiblemente producto de estas células. Adicionalmente, también ocurre la activación y acumulación de macrófagos activados, los cuales, junto con linfocitos y fibroblastos, pueden estimular la angiogénesis, lo cual podría explicar el aumento de la vascularidad encontrado en la sinovial de pacientes con AR (McInnes, I. B. and Schett, G., 2011).

El otro aspecto importante que considerar, son las afecciones “estructurales” en el paciente con AR. Sin embargo, no se puede explicar la destrucción del cartílago y hueso sin considerar la participación de varios tipos de células estrictamente conectadas por una intrincada red de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento (ver Figura 4). Como ya se mencionó, en esta etapa, la membrana sinovial se convierte en hiperplásica, lo que comprende una capa de revestimiento superficial de los fibroblastos sinoviales y los macrófagos, los cuales a su vez recubren una zona intersticial que contiene un infiltrado celular constituido por fibroblastos sinoviales, macrófagos, mastocitos, células T CD4<sup>+</sup>, células T CD8<sup>+</sup>, células asesinas naturales (NK), células B y células plasmáticas. La membrana sinovial inflamada invade el cartílago adyacente, al mismo tiempo que promueve la destrucción de la articulación mediante la expresión, activación y secreción de MMPs y la activación de los osteoclastos, los condrocitos y fibroblastos sinoviales (Perricone, Ceccarelli, & Valesini, 2011). Debido a su efecto patológico, este último tipo celular pueden exhibir un comportamiento parecido a un tumor localizado, que invade y destruye el cartílago articular, el hueso subcondral, tendones y ligamentos (Firestein, 2013).

### **1.1.3 Tratamiento.**

Las estrategias terapéuticas para el tratamiento de la AR han cambiado significativamente a lo largo de estos últimos 20 años: ahora el objetivo no es sólo controlar la inflamación sino prevenir la discapacidad y daño estructural, e incluso alcanzar la remisión (ausencia de síntomas clínicos). En este sentido, el único factor globalmente aceptado para conseguir estos resultados es el diagnóstico y tratamiento precoz con medicamentos modificadores de la enfermedad (FARMEs) (Tedesco et al. 2009).

Algunas de las estrategias de tratamiento más utilizadas en la AR incluyen medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), los cuales disminuyen el dolor y la inflamación, mediante la inhibición de las ciclooxigenasas (COX1 y COX2) y el bloqueo de la secreción de mediadores pro-inflamatorios. Sin embargo se reconoce que su acción sólo bloquea los síntomas, pero no induce un efecto significativo sobre el curso de la enfermedad (Chen et al.

2008, McCabe et al. 1998). Por el contrario, su empleo prolongado puede favorecer la aparición de eventos adversos.

Los glucocorticoides son otra alternativa farmacológica para controlar los síntomas de pacientes con AR debido a su potente efecto anti-inflamatorio y analgésico. Sin embargo debido a que presenta diversos efectos adversos (infecciones, riesgo cardiovascular, etc.) (Malysheva et al. 2008), se recomienda su empleo a dosis bajas y por períodos cortos (Neeck 2002).

La primera alternativa de tratamiento empleada por los reumatólogos son los FARMES, los cuales además de disminuir la inflamación, previenen el daño estructural y pueden llevar a la remisión en el 50-80% de los pacientes, sobre todo en aquellos que iniciaron su uso poco tiempo después del inicio de los síntomas (Cisneros, 2017). Aunque su mecanismo de acción no se conoce completamente, varios estudios en modelos animales y en humanos han mostrado que ejercen un efecto inhibitor de la respuesta inmunológica adaptativa sistémica, favoreciendo un descenso de los títulos de autoanticuerpos y proteínas de fase aguda. A pesar de sus ventajas, sus efectos no se observan rápidamente, por lo que se prefiere esquemas de tratamiento combinado o con rápido escalamiento. Por otro lado, existe un porcentaje significativo de los pacientes que muestran resistencia a sus efectos, al tiempo que su uso prolongado conlleva a efectos adversos gastrointestinales.

Por ejemplo, dentro de los FARMES más utilizados en el tratamiento de la AR está el metotrexato (MTX), el cual es hoy considerado el estándar de oro de los fármacos para este padecimiento al inhibir la síntesis de purinas y pirimidinas, reducir la proliferación de linfocitos T y suprimir la inflamación mediante liberación de adenosina.

Otra alternativa farmacológica más reciente para el control de la AR es el empleo de los FARMES biológicos. El objetivo de las terapias biotecnológicas en la AR es la obtención de efectos clínicos efectivos mediante la inhibición o regulación de blancos moleculares muy específicos, lo que permite efectos en un lapso de menor tiempo y con poco compromiso del metabolismo a nivel sistémico disminuyendo los posibles efectos secundarios. (Cisneros 2017). Se trata de proteínas de origen biotecnológico diseñadas para bloquear de manera selectiva factores inmunológico clave en la generación de la inflamación (p. ejemplo, anticuerpos o receptores solubles para bloquear mensajeros como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, entre otras (Bingham

2008, McInnes and Schett 2007, Smolen et al. 2007). Esta estrategia ha mostrado efectos benéficos en los pacientes con AR, ya que influye tanto en la respuesta inflamatoria como en la desregulación autoinmune. En este sentido, el empleo combinado de biológicos con FARMES ha permitido un efecto positivo en cerca del 80-90% de los pacientes con AR y casi el 100% de los pacientes con Espondiloartropatías. Sin embargo, aun así, se ha observado que un porcentaje minoritario de los pacientes son resistentes a estos medicamentos (Fan and Leong 2007, Sizova 2008). La principal desventaja de esta estrategia, sin embargo, radica en su elevado costo para que pueda emplearse de manera generalizada en la población de pacientes.

De acuerdo con todo lo antes mencionado, a pesar de conocer muchos pasos del proceso fisiopatológico, resulta fundamental la identificación de nuevos biomarcadores de la AR que orienten al especialista a la obtención de un diagnóstico y respuesta al tratamiento de manera más específica.

## **1.2 ADIPOCITOCINAS**

En años recientes se ha reconocido que el tejido adiposo secreta varias moléculas bioactivas llamadas adipocinas o “adipocitocinas” que provienen principalmente del tejido adiposo blanco (ver Tabla 2) y que parecen jugar un papel importante en la homeostasis de varios procesos fisiológicos. Entre estos procesos se puede incluir: la ingesta de alimentos, la regulación del equilibrio energético, la acción de la insulina, el metabolismo de la glucosa (ej. Proteína estimuladora de acilación (ASP), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6), resistina, leptina y adiponectina; también participan en la remodelación de la vascularización, la regulación de la presión arterial y la coagulación [ejemplo el angiotensinógeno y el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1)] (Bays 2004).

Existen dos tipos de tejidos adiposos: el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo marrón (TAM). Ambos tienen capacidad de metabolizar y almacenar lípidos, sin embargo, sus funciones principales son claramente distintas. El TAB es el órgano específico que almacena la energía sobrante en forma de lípidos esterificados y es capaz de proveer de energía en forma de ácidos grasos y glicerol. Por otro lado, la función fisiológica del TAM es permitir la disipación

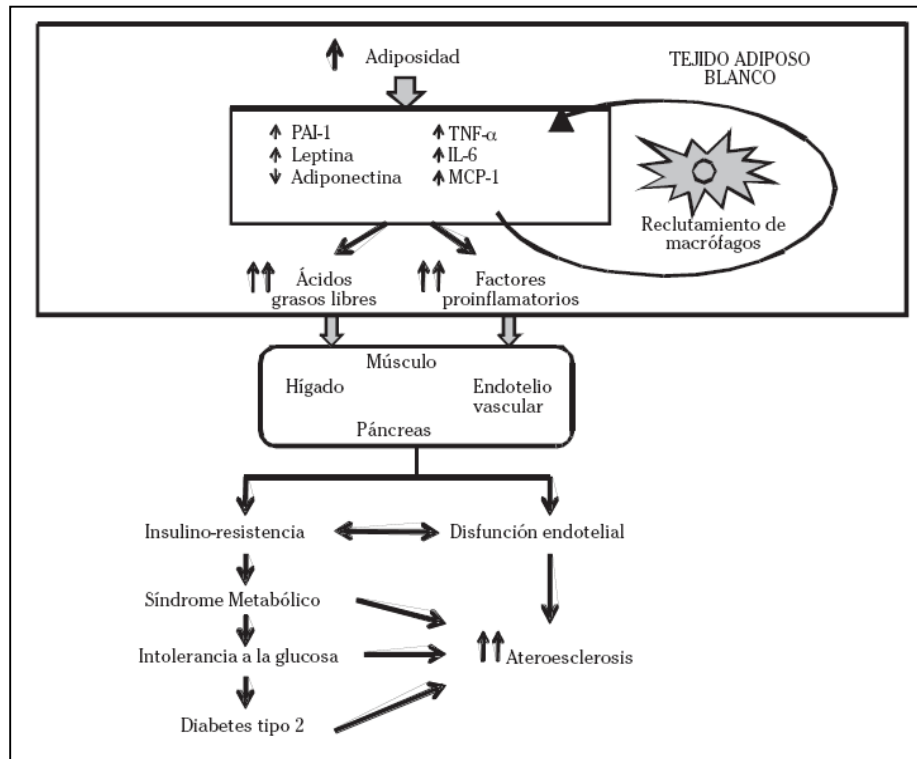
de la energía almacenada en los ácidos grasos en forma de calor, regulando la temperatura (Sánchez–Muñoz 2005).

Varios estudios sugieren que la expresión y síntesis de las adipocinas está regulada por las alteraciones del TAB, ya sean o no patológicas. Así, por ejemplo, se ha observado que la obesidad ocasiona una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado que se caracteriza por la producción anormal de citocinas y la activación de vías de señalización relacionadas con las respuestas inflamatorias (Wellen 2003).

Así también la obesidad, es la presencia de grasa excesiva corporal acumulada, lo que ocasiona la expansión del TAB, por lo cual, el papel patogénico del tejido adiposo parece estar determinado por su ubicación anatómica específica. De hecho, aunque los tejidos adiposos subcutáneos y viscerales se asocian con un perfil de riesgo metabólico, el tejido adiposo visceral se es el que se correlaciona principalmente con el desarrollo de síndrome metabólico (Koster, 2010). En sujetos obesos, los adipocitos blancos del TAB tienen una mayor liberación de ácidos grasos a través del proceso de lipólisis, lo que conduce a niveles elevados de ácidos grasos en suero y una sobre producción de TNF-  $\alpha$ . El TNF- $\alpha$  así como las ya mencionadas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-18) son expresadas y secretadas por el tejido adiposo. Así, la ingesta excesiva de nutrientes, algunas infecciones virales y bacterianas, así como el estrés oxidativo pueden provocar un aumento en los niveles de secreción de estas citocinas que conducen a la inflamación crónica en TAB favoreciendo la activación e infiltración de macrófagos maduros, los cuales parecen tener una función crucial en el desarrollo de la inflamación observada en la obesidad, de hecho, su reclutamiento se correlaciona con el grado de obesidad ya que son las principales células secretadoras de citocinas en el tejido adiposo (Chawla, 2011). Varios estudios han demostrado que el incremento en la secreción de citocinas como el TNF- $\alpha$  puede estimular a los preadipocitos y a las células endoteliales a producir la proteína quimioatrayente de macrófagos (MCP-1), atrayendo a los macrófagos y favoreciendo la infiltración de estos al tejido adiposo. Una vez infiltrados en el tejido adiposo, los macrófagos maduros comienzan a secretar citocinas (quimocinas) y la propia MCP-1. Este patrón de secreción, junto con el producido por adipocitos y otros tipos celulares, genera un círculo vicioso de reclutamiento de macrófagos y producción de citocinas inflamatorias, llevando a una



inflamación primaria local en el tejido adiposo (Figura 6). Posteriormente, estas citocinas secretadas por el tejido adiposo podrían desencadenar el aumento de la producción de proteínas inflamatorias en el hígado, músculo y el páncreas lo que podría conducir así a la inflamación sistémica de bajo grado observada en obesidad (Moreno, 2005)

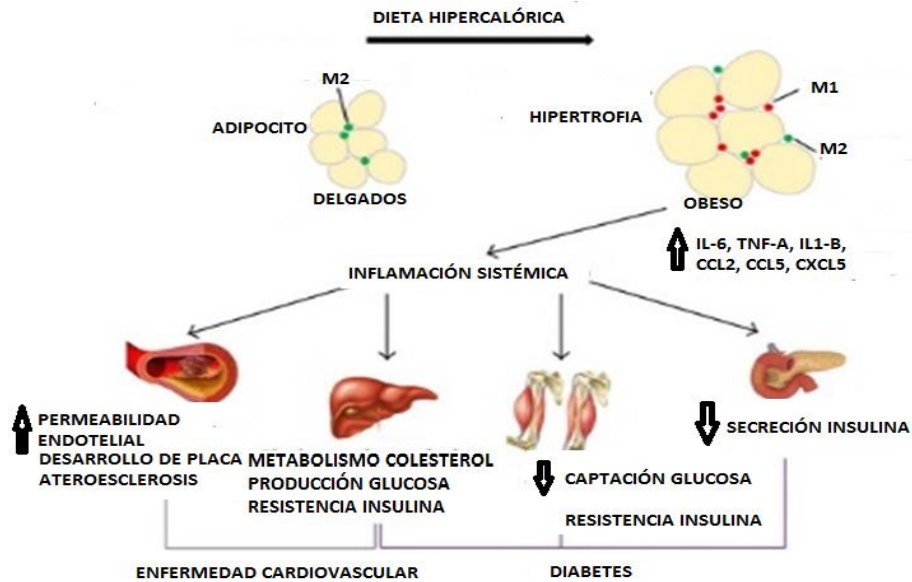


**Figura 6. Potenciales mecanismos por los que la obesidad promueve un estado inflamatorio crónico.** Se muestran algunas de las citocinas que se desregulan durante el proceso inflamatorio en la obesidad y las enfermedades que están relacionadas con este efecto. Inhibidor del activador del plasminógeno-1: PAI-1; Factor necrosis tumoral: TNF- $\alpha$ ; Interleucina 6: IL-6; Proteína quimioatrayente de macrófagos: MCP-1. Marcos-Gómez, B., Bustos, M., Prieto, J., Martínez, J. A., & Moreno-Aliaga, M. J. (2008). Obesidad, inflamación e insulino-resistencia: papel de los ligandos del receptor gp 130. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 31(2), 113-123.

Los macrófagos que se infiltran en el TAB se clasifican en dos subtipos: 1) macrófagos activados por la vía clásica, denominados M1, los cuales secretan las citocinas pro-inflamatorias ya mencionadas; y 2) macrófagos activados alternativamente, denominados M2, los cuales secretan citocinas antiinflamatorias como IL-10 (Chawla, 2011). Además de la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo, la obesidad causa un cambio fenotípico del fenotipo M2 a M1, que se correlaciona con la resistencia a la insulina tanto en ratones como en humanos (Fujiska

2009). Las señales autocrinas y paracrinas emitidas por los macrófagos M1 pueden alterar la señalización de la insulina y la adipogénesis en los adipocitos, mientras que los macrófagos M2 parecen proteger contra la resistencia a la insulina inducida por la obesidad (figura 5) (Fujiska 2009).

La expansión del tejido adiposo por la infiltración de macrófagos y el acumulo de ácidos grasos ocasiona aumento de tamaño de los adipocitos (hipertrofia) y por otro, el incremento en el número de adipocitos (hiperplasia). Se ha propuesto que los adipocitos hipertróficos pueden ser responsables de hipoxia en el tejido adiposo debido a la insuficiencia de vascularización y suministro de oxígeno. Se sabe que la hipoxia puede inducir el reclutamiento de macrófagos, por lo tanto, la expresión de citocinas, lo que conlleva a la inflamación y disfunción del tejido adiposo. La hipertrofia también puede provocar la necrosis de los adipocitos y la liberación de su contenido celular en el espacio extracelular desencadenando una respuesta inflamatoria. Particularmente, algunos de los adipocitos senescentes o muertos se rodean de macrófagos para formar las "estructuras tipo corona" observadas en la expansión del tejido adiposo (O'Rourke, 2011). Los macrófagos con hiperplasia se forman a partir de los preadipocitos mesenquimáticos (células adiposas indiferenciadas). En estos preadipocitos, aumenta la expresión de la lipoproteinlipasa (LPL), lo cual es un signo temprano de diferenciación de los preadipocitos, seguido la etapa en que se detiene el crecimiento celular. Los adipocitos viscerales hipertróficos/hiperplásicos tienen menor densidad de receptores para insulina y mayor densidad de receptores adrenérgicos  $\beta$ -3, lo que condiciona el aumento de las tasas de lipólisis, que facilita la diapédesis de monocitos hacia el estroma adiposo visceral, que inicia un ciclo pro-inflamatorio con repercusión local y sistémica (Figura 7) (Fujisaka,2009)



**Figura 7: El exceso de grasas derivadas de un balance energético positivo mantenido en el tiempo, determina la expansión del volumen del tejido adiposo y aumento de macrófagos M1 en el tejido.** Las características biológicas de este proceso determinarán las consecuencias metabólicas y cardiovasculares de la obesidad. M1: macrófagos tipo M1; M2: macrófagos tipo M2; IL-6: interleucina 6; TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa; IL-1β: interleucina uno beta; CCL2 y CCL5: CC motif chemokine ligand 2 and 5; CXCL5. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, et al. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages Diabetes. 2009 Nov;58(11):2574-82

Actualmente, se sabe que el tejido adiposo es capaz de expresar y secretar una gran variedad de péptidos bioactivos, conocidos como adipocitocinas, que actúan de manera autocrina/paracrina y endocrina (Tabla 2) y juegan un papel importante en la regulación energética del organismo. La producción y liberación de adipocinas es una de las funciones importantes de los adipocitos.

**Tabla 2.** Principales moléculas secretadas por el tejido adiposo blanco y función fisiológica.

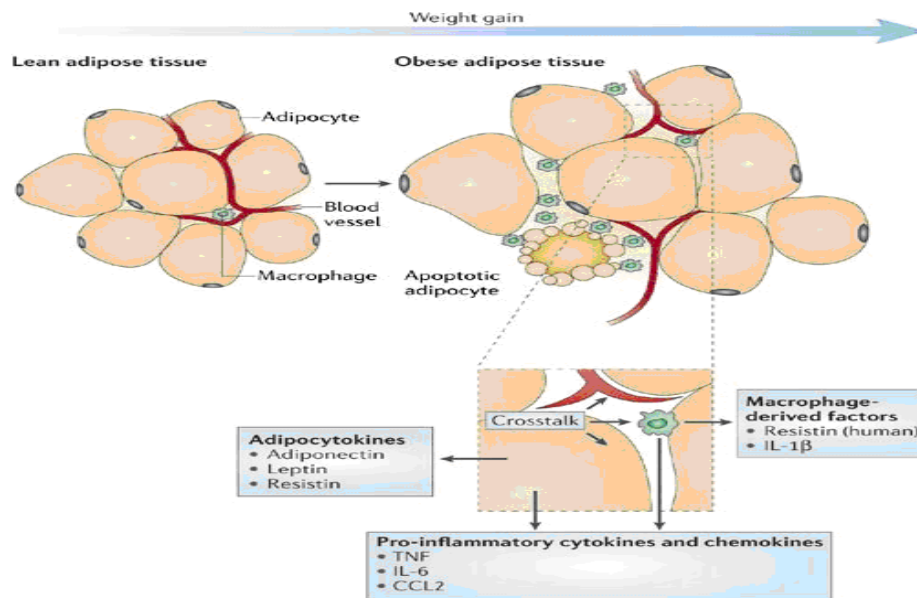
<b>Molécula</b>	<b>Función</b>
Leptina	Disminuye la ingesta, deposición de las grasas y regula el balance energético. Inflamación
NPY	Proliferación de preadipocitos
Adiponectina	Hormona con efectos contrarios a la leptina, se propone que tenga efectos antiinflamatorios y antiaterogénicos. Sensibilidad a la insulina, inflamación
Resistina	Sensibilidad a la insulina, inflamación
Visfatina	Sensibilidad a la insulina, inflamación
Omentina	Sensibilidad a la insulina
Vaspina	Sensibilidad a la insulina
Apelina	Homeostasis vascular
Adipsina	Inflamación
LPL	Metabolismo lipídico
ApoE	Metabolismo lipídico
TNF- $\alpha$	Incrementa la lipólisis y activa la LPL. Inflamación
Resistina	Disminuye sus niveles con la diferenciación de adipocitos y mejora la resistencia a la insulina
FIAF	Implicado en la regulación del metabolismo en situaciones de ayuno
PAI-1	Contribuye al desarrollo de obesidad y la resistencia a la insulina
Adipsina	actúa probablemente de forma autocrina regulando el metabolismo lipídico
Interleucinas (IL-1, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18)	Posible regulador del balance energético, contribuye a la resistencia a la insulina. Inflamación, ; la IL-1 también interviene en el metabolismo energético, en la sensibilidad a la insulina y en el control de la ingesta
PCR	Inflamación
MCP-1	Incorporación de macrófagos al tejido
ICAM-1	Activación de macrófagos
VEGF	Angiogénesis
TGF-B	Migración y adhesión celular, crecimiento y diferenciación tisular
IGF-I	Metabolismo lipídico, sensibilidad a la insulina
Ácidos grasos simples	Reguladores de la expresión génica de genes relacionados con el metabolismo y transporte de ácidos grasos

NPY: Neuropeptido Y. LPL: Lipoproteína lipasa. ApoE: Apolipoproteína TNF-  $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa. FIAF: factor adiposo inducido por ayuno. PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1. PCR: Proteína C reactiva. MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos-1. ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1. VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular. TGF-b: Factor de crecimiento transformante beta. IGF-I: Factor de crecimiento insulínico de tipo I.

Varios estudios han mostrado que la obesidad ocasiona una respuesta inflamatoria crónica caracterizada por la producción anormal de citocinas y la activación de vías de señalización relacionadas con las respuestas inflamatorias (Wellen 2003). Un aspecto muy interesante es que la interrelación entre inflamación crónica y desordenes tales como la obesidad, la diabetes tipo 2 (DT2), la enfermedad cardiovascular y al síndrome metabólico, lo cual permite sugerir que coinciden en los mecanismo moleculares Así entonces, el cambio en

el perfil de adipocitocinas expresadas durante la obesidad conlleva elementos nuevos a considerar para entender el desarrollo de enfermedades como complejas como la DT2, el síndrome metabólico y la AR (Sánchez-Muñoz 2005).

De manera reciente se han reunido evidencias experimentales que apoyan la participación de las adipocinas en la regulación de la respuesta inmune y, particularmente, en la respuesta inflamatoria. Así entonces, la expansión del tejido adiposo durante el aumento de peso generalmente va a derivar en un aumento en los niveles de adipocitocinas tales como leptina, ghrelina y resistina, las cuales parecen ejercer efecto sobre células del sistema inmune, modificando su activación y regulación. Adicionalmente, de manera característica durante la obesidad, se ha observado el reclutamiento de macrófagos, vía el ligando de quimiocina (CCL2), entre otras señales (Kanda 2006). Estos macrófagos activados pueden fagocitar los adipocitos en proceso de apoptosis, dando origen a las células espumosas, las cuales amplifican la inflamación local y sistémica (Tilg 2006) (ver Figura 8).



**Figura 8. Adipocitocinas: mediadores entre el tejido adiposo, inflamación e inmunidad.** La expansión del tejido adiposo durante el sobrepeso conlleva al reclutamiento de macrófagos a través de señales, que incluyen quimiocinas sintetizadas por adipocitos, como el ligando 2 de quimiocinas CC (CCL2). Estos macrófagos se encuentran principalmente alrededor de adipocitos apoptóticos. Diversas citocinas sintetizadas por adipocitos y macrófagos residentes pueden contribuir a la inflamación local y sistémica. El pool de adipocitocina-citocina en general favorece un medio proinflamatorio. IL interleucina; TNF factor de necrosis tumoral. Tilg H, Moschen A. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity *Nat Rev Immunol.* 2006 Oct;6(10):772-83

### 1.2.1 LEPTINA

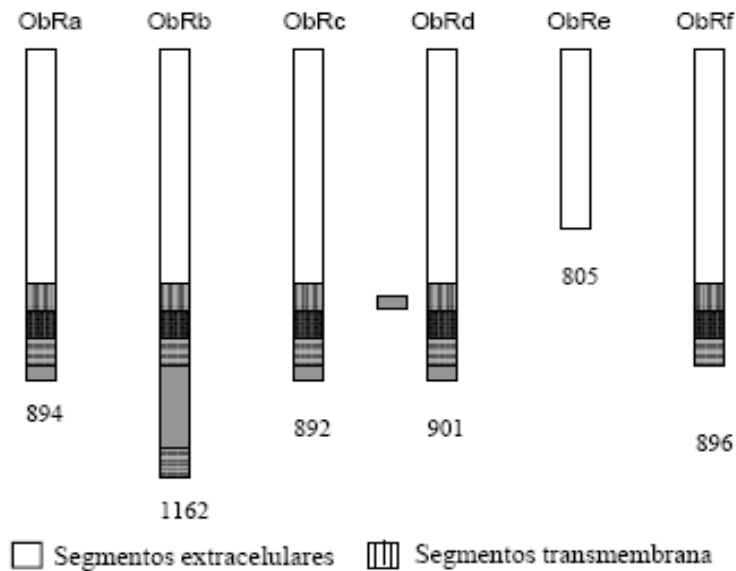
El avance en el conocimiento de la leptina ha permitido ampliar las perspectivas de la investigación de los agentes que regulan el contenido graso del organismo, el balance energético corporal y los mecanismos que dan inicio al desarrollo puberal. Todo esto ha permitido proponer que el tejido adiposo es también una glándula endócrina, siendo uno de sus productos principales la leptina. Esta molécula puede intervenir de forma dinámica tanto en la regulación de la ingesta alimentaria como en el balance energético del organismo. La publicación de más de 35120 artículos científicos (Pubmed, enero 2019) sobre la leptina muestran el interés por conocer su fisiología y su potencial participación en la génesis de diversas enfermedades.

La leptina es un polipéptido de 167 aa que regula el peso corporal al señalar el estado nutricional de otros órganos, especialmente el hipotálamo, que produce neuropéptidos y neurotransmisores que modulan el consumo de energía y el gasto energético para inhibir la ingesta de alimentos en función del contenido en triglicéridos de los adipocitos (Silleras, 2004). Los efectos hipotalámicos de la leptina se resumen en disminución del apetito y aumento del metabolismo basal, con la consecuente pérdida de peso y activación del eje gonadal por aumento de la secreción de GnRH (Kishi, 2005). También hay datos que indican una acción directa de la leptina sobre los tejidos periféricos al reducir la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos y aumentar la oxidación lipídica, lo que a su vez podría explicar la mejoría que produce ésta en la homeostasis de la glucosa. En los ratones obesos ob/ob el gen de la leptina está mutado de manera que son incapaces de producir esta hormona y transmiten el rasgo de forma recesiva (Tai, 2000)

La leptina regula la lipogénesis hepática mediante la supresión de la expresión de enzimas clave en la ruta de síntesis de ácidos grasos y la mejora de la beta-oxidación de lípidos del músculo mediante la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) (Ren, 2005). A nivel de señalización celular, la leptina activa su receptor específico, el cual existe en diferentes variantes. Asimismo, existen múltiples vías “rio abajo” (downstream) del receptor de leptina y donde una de ellas media varias de las actividades de la leptina (Duan 2004). Durante la

diferenciación de los adipocitos, la expresión de la leptina aumenta de manera directa con la acumulación de gotas de lípidos. La principal vía de señalización de la leptina es la vía de JAK-STAT, que regula la expresión de neuropéptidos supresores del apetito. El efecto antidiabético de la leptina media la activación central de la ruta fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)/AKT y que estimula la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos (St-Pierre 2012; Havel, 2004 ).

Por otra parte, actualmente se reconocen múltiples isoformas del receptor para la leptina, tanto en ratas como en humanos; las cuales comprenden tantas formas cortas como largas (Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re y Ob-Rf) (Figura 9). Desde el punto vista estructural, el receptor está conformado por 3 regiones: 1) una zona extracelular compuesta de aproximadamente 816 aminoácidos; 2) un dominio transmembranal de 34 aminoácidos y 3) un dominio citoplasmático efector compuesto por 303 aminoácidos, el cual es responsable de la activación de las señales intracelulares. Los receptores humanos y de rata tienen gran similitud en la secuencia de aminoácidos tanto del dominio extracelular (78%) como del intracelular (71%) (Tartaglia1995). El receptor más largo corresponde a un polipéptido de alrededor de 1000 aa (Ob-Rb), insertado en la membrana plasmática y que presenta dominios extracelulares, transmembranal e intracelular; esto último sugiere que puede transducir señales hacia el interior de la célula. Adicional a las diferentes isoformas del receptor membranar (Ob-Re), se ha observado una forma que carece de los dominios intracelular y transmembranar, lo cual posiblemente implique que pueda funcionar como proteína de transporte de la leptina en el plasma ((Tartaglia 1995). Mientras que las formas largas del receptor (OB-RL) predominan en el hipotálamo, las formas cortas (OB-Rs) se encuentran en los demás tejidos. Los receptores Ob-Rb (forma larga) parecen mediar los efectos a nivel intracelular, principalmente por intermediación de las proteínas JAK-STAT3 y MAPKs (Giuseppe Matarese 2005). Por su parte, las isoformas cortas (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd y Ob-Rf) se han relacionado con el transporte de la leptina y con la regulación del sistema inmune (Otero 2005)



**Figura 9. Representación esquemática de la estructura general de los diferentes subtipos de receptores de leptina (ObR).** Las regiones de alta homología entre los diversos subtipos están representadas por los mismos símbolos; el número total de residuos de aminoácidos está indicado en la parte inferior del esquema correspondiente a cada subtipo. Sánchez, J. (2009). Perfil fisiológico de la leptina. *Colombia Médica*,.

Por otro lado, la leptina tiene una sorprendente similitud estructural con las citocinas y múltiples estudios han demostrado que modula la respuesta inmune. Así también, la leptina comparte la misma vía JAK-STAT río abajo de su receptor, con una familia amplia de citocinas, tales como IL-6. La expresión de la leptina puede ser inducida por TNF- $\alpha$ . (St-Pierre, 2012). En un inicio, la relación entre la leptina y la respuesta inmune había sido sólo teórica, basado en el hecho de que varias células de importancia inmunológica presentaban receptores para la leptina (Otero 2005). Pero posteriormente se ha observado que leptina mejora la respuesta inmunitaria a través de la activación de las células presentadoras de antígeno (APC), la función y proliferación de las células Th1 y la mediación de la secreción de las citocinas pro-inflamatorias, como TNF- $\alpha$ , IL-2 o IL-6 (Fernández, 2010).

La leptina es una molécula de acción pleiotrópica, que puede funcionar como una hormona y también como citocina (también conocida como “adipocina”). Casi todas las células inmunes, como los neutrófilos, los monocitos, los linfocitos expresan el receptor de leptina, el cual, en base a su estructural, se considera como miembro de la familia de los receptores de citocinas de clase I (Fantuzzi, 2009). La leptina regula la angiogénesis, la hematopoyesis, la



inmunidad innata y adaptativa e induce la respuesta Th1 al aumentar la producción de IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\alpha$ , lo que posteriormente conduce a la activación de monocitos/macrófagos, al tiempo que también parece prevenir la apoptosis de varias células inmunitarias (Rasso, 2002)

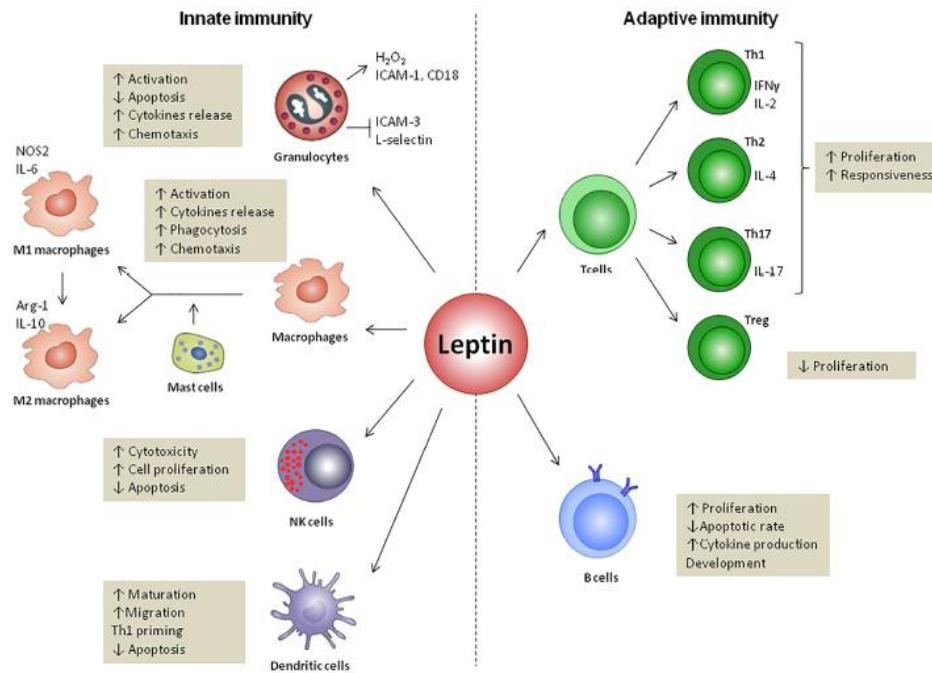
En la inmunidad innata, la leptina aumenta la actividad y la función de los neutrófilos mediante la liberación de radicales libres de oxígeno, el aumento de la expresión de CD11b y la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1), que favorece la migración de células inmunitarias a los sitios de inflamación (Zarkesh-Esfahani), 2004). La leptina activa los monocitos y a las células dendríticas que, a su vez, lleva a la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , la IL-6 junto con la IL-12, una citocina que permite la diferenciación hacia el fenotipo Th1 (Mattioli, 2005).

Así también, la leptina también promueve la supervivencia de las células dendríticas al desencadenar la activación del factor nuclear kappa B (NF-kappa B) y aumentar la expresión de Bcl-2 y de Bcl-x, a través de la vía de señalización PI3K/AKT (Mattioli, 2005). Además, tras la estimulación con leptina, las células dendríticas también muestran un aumento en la producción de múltiples citocinas, incluidas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  e induce la expresión de moléculas de superficie, tales como CD1a, CD80, CD83, o CD86 (Mattioli, 2009). Indirectamente, la leptina promueve la activación de las células asesinas naturales (NK) a través de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en monocitos y macrófagos (Raffail. 2008).

En la inmunidad adaptativa, la leptina induce la maduración y supervivencia de las células T tímicas al reducir el proceso de apoptosis mediante la inhibición de la vía mediada por FAS (Velloso, 2009). Asimismo, la leptina tiene efectos anti-apoptóticos en linfocitos T, al regular la expresión de Bcl-xl, el factor de transcripción de T-bet. (Da Silva, 2013) y, junto con otras citocinas, promueve la proliferación de linfocitos. y activación posiblemente a través de un transductor de señal y un activador de señalización de transcripción 3 (STAT3) (Papathanassoglou,2006). A nivel inmunológico, la deficiencia de leptina tanto en modelos murinos como en el humano da como resultado defectos inmunitarios graves caracterizados por la disminución de los linfocitos totales, el número de células T cooperadoras CD4<sup>+</sup>, el aumento de la apoptosis en el timo, y una diferenciación del fenotipo Th1 hacia Th2, lo que resulta en una mayor susceptibilidad a las infecciones intracelulares (Fujita 2002). Así también

leptina promueve la secreción de IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  de las células Th1 y suprime la producción de IL-10 e IL-4 de células Th2 (Kim 2010). Además, la leptina también activa las células B humanas para secretar citocinas, como IL-6, IL-10 y TNF- $\alpha$ , a través de la activación de las vías de señalización JAK2/STAT3 y p38MAPK/ERK 1/2 (Agrawa, 2011).

En conclusión, la leptina actúa como una citocina tipo Th1 y regula todas las células inmunes a través del receptor de leptina, afecta así las respuestas inmunes innatas y adaptativas, polarizando hacia la respuesta de tipo Th1 (ver Figura 10).



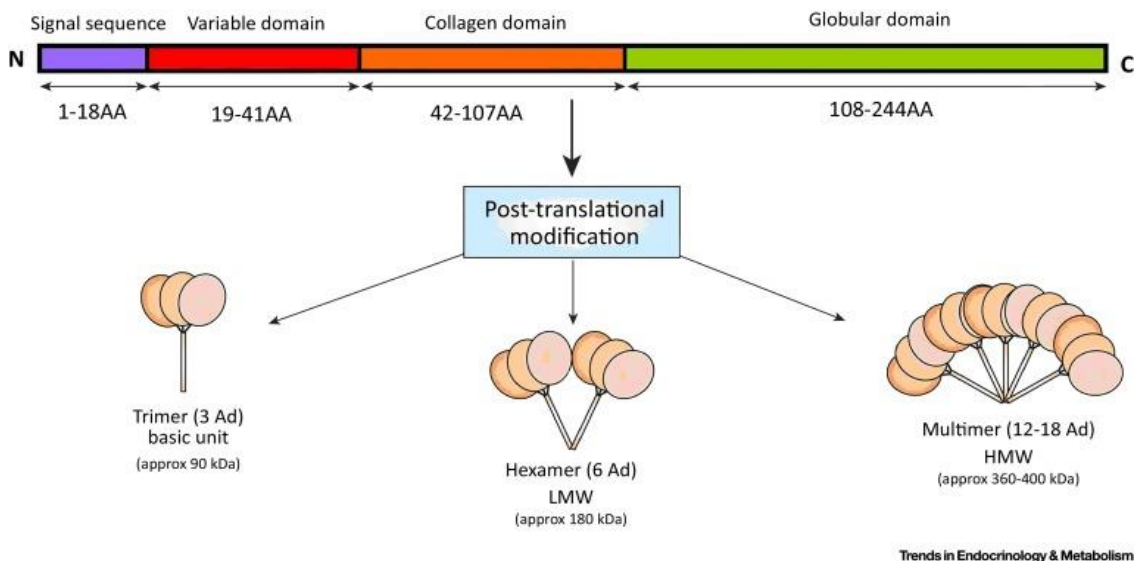
**Figura 10. -Efectos de Leptina en la respuesta inmune innata y adaptativa.**

La leptina regula la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, a través de la modulación de la supervivencia y proliferación de las células inmunes, así como de su actividad. En la inmunidad innata, la leptina aumenta la citotoxicidad de las células asesinas naturales (NK) y promueve la activación de granulocitos, macrófagos y CD. La leptina también regula la polarización del fenotipo M1 o M2 otorgándoles marcadores de las células T helper tipo 1 (Th1). En la inmunidad adaptativa, la leptina aumenta la proliferación de células T vírgenes y células B mientras reduce la de las células T reguladoras (Treg). La leptina promueve el cambio hacia un Th1 proinflamatorio (que secreta IFN $\gamma$ ) en lugar del fenotipo Th2 antiinflamatorio (que secreta IL-4), y facilita la respuesta Th17. F Vera, Pino J, Campos-Cabaleiro V, Ruiz-Fernández C, Mera A, Gonzalez-Gay M.A., Gómez R, Gualillo O, Obesity, Fat Mass and Immune System: Role for Leptin, *Frontiers in Physiology* 2018,9,640

## 1.2.2 ADIPONECTINA

La adiponectina es una molécula codificada por el gene *Apm1*, que ha sido mapeada en el cromosoma 3 (3q27) y que expresa una proteína de 244 aminoácidos. Su estructura consiste en un dominio fibroso semejante al del colágeno y un dominio globular semejante al factor de complemento C1q. La Adiponectina se ensambla en homotrimeros y su secreción es estimulada por la insulina. Fue reportada por primera vez en 1995 por Scherer y colaboradores (Scherer 1995)

La adiponectina, también conocida como Acrp30 o adipoQ, es una proteína expresada exclusivamente en adipocitos diferenciados, y cuyo papel en la respuesta inflamatoria aparentemente es opuesto al efecto de la Leptina (Fig. 11).



**Figura 11 Estructura de Adiponectina.** Adiponectina requiere modificaciones post-traduccionales para su actividad. Adiponectina es secretada por adipocitos en la isoforma trimérica (~90kDa; la unidad básica), bajo peso molecular (LMW) hexámeros (~180kDa), y alto peso molecular (HMW) (12–18-mer;>400kDa). Wang Y, Ma XL, Lau WB. (2017) Cardiovascular Adiponectin Resistance: The Critical Role of Adiponectin Receptor Modification Trends Endocrinol Metab. Jul;28(7):519-530..

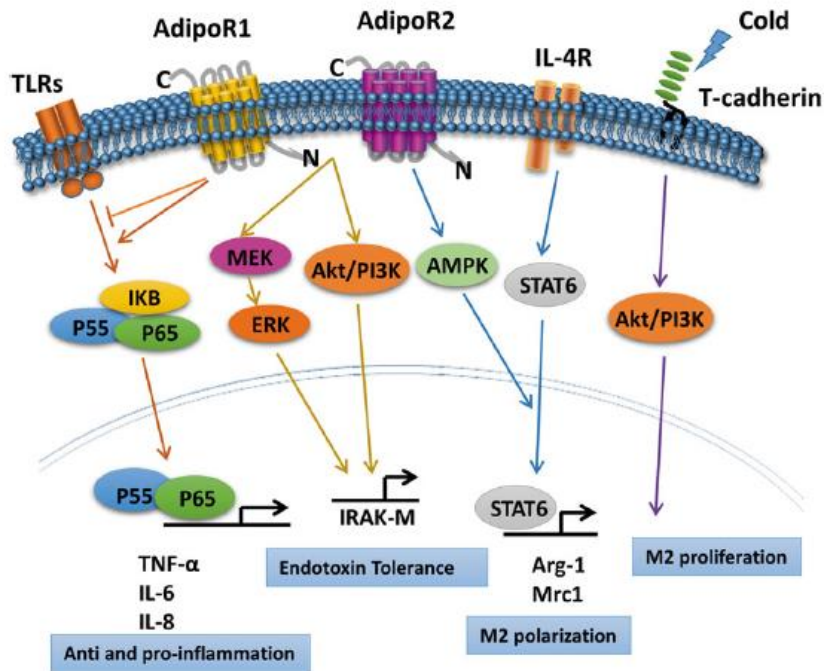
Entre las diferentes acciones fisiológica, la adiponectina puede aumentar la acción de la insulina y, parcialmente, revertir la resistencia a la insulina en ratones obesos (Brichard, 2003). Consistentemente, se ha encontrado que los ratones deficientes en adiponectina desarrollan resistencia a la insulina asociada con un alto nivel de TNF- $\alpha$  en el tejido adiposo y una capacidad

de respuesta reducida a PPAR $\lambda$ . También se ha encontrado que la adiponectina parece inhibir la aterogénesis, al tiempo que promueve la actividad cardioprotectora en la cardiopatía isquémica, por un mecanismo dependiente de las vías de CAMK y ciclooxigenasa 2 (Cox-2) (Fantuzzi, 2005).

La señalización de adiponectina está mediada por dos receptores de adiponectina, AdipoR1 y AdipoR2. AdipoR1 se expresa ubicuamente, mientras que AdipoR2 se enriquece en el hígado (Capeau, 2007; Yamauchi, 2007). La activación de AdipoR1 en el hígado y los tejidos musculares aumenta la actividad de AMPK, que parece favorecer un efecto insulino-sensibilizador y también mejora la beta-oxidación de los ácidos grasos. La vía AdipoR2 en el hígado aumenta PPAR $\alpha$  y la expresión de sus blancos biológicos, lo que también da como resultado un aumento de la beta-oxidación de ácidos grasos (Havel, 2004). La Adiponectina también tiene efectos antiinflamatorios que contribuyen a su papel protector contra la tensión metabólica en la obesidad. La adiponectina suprime la producción de TNF- $\alpha$  en ratones obesos y los ratones deficientes en adiponectina tienen altos niveles de TNF- $\alpha$  en el tejido adiposo (Fantuzzi, 2005). Asimismo, la adiponectina inhibe la actividad nuclear del factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y sus moléculas de adhesión (TGF-  $\beta$ ) “rio abajo” que conducen a una reducción de la adhesión de los monocitos a las células endoteliales (Yamauchi, 2007).

Los niveles séricos en humanos de la adiponectina se encuentran entre los 5-10 microgramos por mililitro y aparentemente se encuentra inversamente relacionado a la cantidad de grasa visceral (Comuzzie 2001). En este sentido, se ha podido observado que los ácidos grasos libres derivados de la grasa visceral parecen inducir efectos en músculo y endotelio a través de estimular la expresión de TNF- $\alpha$ . A su vez, la presencia de TNF- $\alpha$  induce señales en el interior del miocito y la célula endotelial, vía la participación de dos tipos de segundos mensajeros denominados JNK (Janus-C-terminal cinasa) y MAPK cinasas (cinasas activadoras de la mitogénesis), las cuales bloquean las acciones de la insulina a través de bloquear la señalización de su receptor para facilitar el transporte de glucosa (Frühbeck 2006). Adicionalmente, estas rutas de señalización están relacionadas con la vía inflamatoria más importante conocida como la vía NF $\kappa$ B/IKK, al final del cual se activa al factor nuclear NF $\kappa$ B que induce modificaciones en la expresión génica de la célula, teniendo efecto sobre la expresión

de las moléculas de adhesión, la resistencia a la insulina, la disfunción endotelial y aterogénesis, entre otras (Frühbeck 2006) .Todas estas acciones al parecer pueden ser inhibidas por la presencia de niveles elevados de adiponectina, lo cual sugiere que el TNF- $\alpha$  y la adiponectina podrían ser considerados antagonistas moleculares (ver Figura 12).



**Figura 12.- Vías de señalización activadas por adiponectina en macrófagos.** AdipoR1 media el efecto supresor de la adiponectina en la activación de NF- $\kappa$ B y las transcripciones posteriores de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 en macrófagos. Los adipoRs y la subsecuente activación de las vías Tpl2/MEK/Erk y Akt/PI3K median el efecto promotor de la adiponectina sobre la tolerancia a la endotoxina en macrófagos. Además, la adiponectina induce la proliferación de macrófagos M2 a través de los mecanismos dependientes de la vía T-cadherina y Akt / PI3K, así mismo promueve la activación de los macrófagos M2 a través de AdipoR2 y AMPK. Luo, Y., & Liu, M. (2016). Adiponectin: a versatile player of innate immunity. *Journal of molecular cell biology*, 8(2), 120-8.

A nivel inmunológico, se ha observado que C1q y adiponectina son capaces de promover la eliminación de las células apoptóticas a través de la tirosina cinasa Merk (Galvan et al., 2014).

La Adiponectina suprime la activación de macrófagos M1 y promueve la proliferación de macrófagos M2, lo que parece explicar su capacidad anti-inflamatoria. Algunos estudios han sugerido que la Adiponectina promueve una respuesta antiinflamatoria, con un aumento de la expresión de marcadores antiinflamatorios como la arginasa-1, Mgl-1, e IL-10, tanto en

macrófagos murinos como en humanos (Wolf et al., 2004; Ajuwon y Spurlock, 2005; Ohashi et al., 2010). Así también se ha demostrado que adiponectina induce la proliferación de macrófagos M2 en el tejido adiposo (Yokota et al., 2000; Hui et al., 2015).

Existe una amplia evidencia que muestra que adiponectina actúa como mediador antiinflamatorio a través de la regulación de la proliferación, plasticidad y diferenciación de macrófagos M1 y M2 (Ajuwon y Spurlock, 2005; Ohashi et al., 2010; Hui et al., 2015). Aunado a lo anterior, se ha demostrado que los niveles séricos bajos de la Adiponectina se asocian con un incremento de los niveles de marcadores inflamatorios (Ouchi et al., 2003; Gil-Campos et al., 2004; Pischon et al., 2004).

En un papel antagónico, la Adiponectina ha mostrado promover un efecto pro-inflamatorio ya que regula positivamente algunas citocinas pro-inflamatorias tales como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 a través la activación de las rutas de NF-kB y Erk (Lappas et al., 2005; Tsatsanis et al., 2005, 2006; Park et al., 2007). Sin embargo, pareciera que la acción pro-inflamatoria de adiponectina es un efecto transitorio, puesto que contribuye a la tolerancia LPS, eventualmente adiponectina atenúa la producción de citocinas mediada por LPS en macrófagos con su exposición continua, lo que sugiere que la exposición a Adiponectina de manera continua induce resistencia al LPS (Tsatsanis et al., 2005, 2006; Park et al., 2007).

Por otro lado, la adiponectina estimula la activación de DC a través de fosfolipasa C a través de las vías de señalización JNK/NF-kB, que permiten la diferenciación hacia una respuesta Th1 y Th17, (Jung et al., 2012).

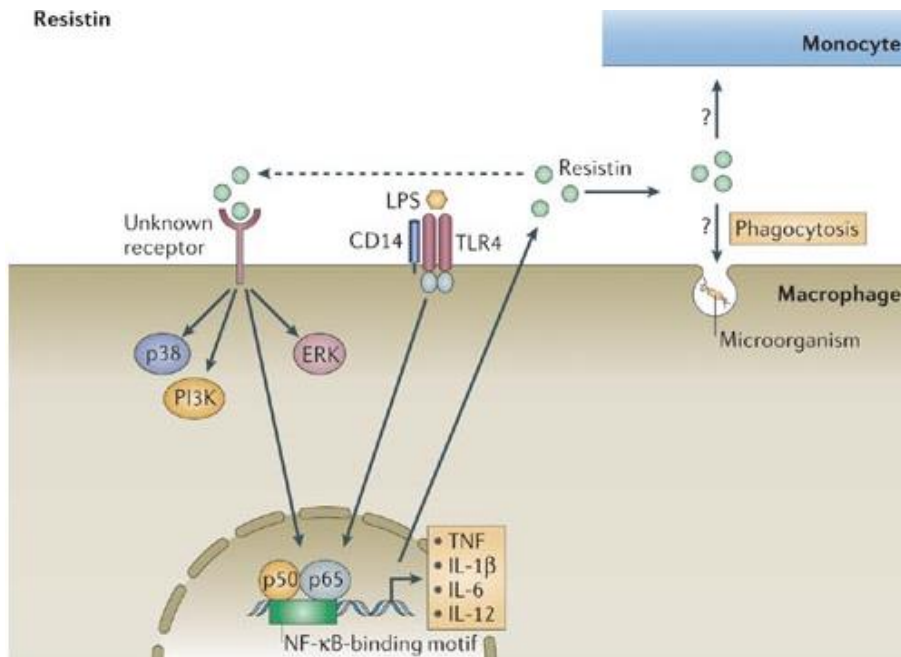
### **1.2.3 RESISTINA**

La resistina es uno de los miembros principales de una familia de 6 genes denominada moléculas similares a resistina (RELM) cuyos miembros son: RETN, RETNLB, en humanos y Retn, Retnla, Retnlb, Retnlg en ratones (Kunnari, 2008). La resistina esta codificada por el gen RETN que se localiza en el brazo corto del cromosoma 19 en la región 13.3 (19p13.3) (Yang y col., 2003). El cual, está constituido por 4 exones y 3 intrones y el ARN mensajero maduro está constituido por 478 nucleótidos. La traducción de la proteína comienza a partir del exón II y termina a la mitad del exón IV llevando a un producto de 108 aa (Kunnari, 2008).

Es un polipéptido monomérico de 12.5 kDa que se puede ensamblar en forma de oligómeros. Se sugiere que se sintetiza por los macrófagos del tejido adiposo, aunque se desconoce gran parte de su fisiología. Se le dio este nombre para resaltar su participación de la resistencia a la insulina (Steppan, 2001).

La resistina ha sido detectada en muestras de TAB (Kunnari, 2008), sin embargo, otros investigadores solo han encontrado una expresión mínima (Janke, Engeli, Gorzelniak, Luft, y Sharma, 2002). Por otra parte, nuevos estudios han encontrado resistina en el TAB pero no en el adipocito (H. K. Park y Ahima, 2013) indicando que otro tipo de células en este tejido pudieran estar produciendo esta proteína. Más adelante se reportó expresión de esta misma en células mononucleares de sangre periférica (S. Lee y col., 2014; Patel y col., 2003; Tsiotra, Boutati, Dimitriadis, y Raptis, 2012), razón por la cual, otros investigadores han atribuido la presencia de resistina en TAB a los macrófagos y/o otras células sanguíneas como los leucocitos que se localizan en dicho tejido (N. Chen y col., 2014). Por otra parte, se ha reportado además una mayor producción de esta adipocina en monocitos y macrófagos, en comparación con el TAB humano (Patel y col., 2003).

De acuerdo con los estudios *in vitro*, la resistina muestra una potente acción pro-inflamatoria y se sugiere que este efecto es dependiente de NFκB (ver Figura 13), por esto, se sugiere que antagoniza los efectos de la adiponectina (Borakewa 2005). Sin embargo, las acciones inmunológicas directamente causadas por la resistina son aún poco conocidas, en especial las relacionadas con la inmunidad adaptativa. Se reconoce que la resistina activa los macrófagos, favoreciendo la liberación de citocinas pro-inflamatorias como TNF-α, e IL-12, (Silswal 2005, Kaser 2003). Un aspecto particularmente llamativo es el hecho de que sus efectos muestran una potencia igual o superior a las endotoxinas, como LPS (Lerkhe 2004). La resistina también podría influir en la inflamación al estimular la expresión de moléculas de adhesión vascular y favoreciendo la infiltración de leucocitos (Verma 2003).



**Figura 13.- Activación a través de resistina a su receptor.** El receptor de la resistina es desconocido, pero esta adipocitocina induce la activación de p38, ERK y PI3K. La resistina aumenta la producción de TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12, sin embargo, su efecto sobre las funciones de los monocitos y macrófagos no se conoce. Mientras que la adiponectina puede considerarse una citocina antiinflamatoria en el tejido adiposo, la leptina y la resistina tienen características proinflamatorias dominantes. I $\kappa$ B, inhibidor de NF- $\kappa$ B; LPS, lipopolisacárido; PPAR, receptor activado por proliferador-peroxisomal; PPRE, elemento de respuesta del proliferador de peroxisoma; TLR4, receptor tipo Toll 4. Modificada de Tilg H. Moschen A. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity Nat Rev Immunol. 2006 Oct;6(10):772-83

En la inflamación inducida por obesidad se ha observado que los macrófagos que se acumulan en el TAB, producen ON (óxido nítrico), TNF $\alpha$ , IL-6 especies reactivas de oxígeno (EROs) y especies reactivas de nitrógeno (ERN), que en conjunto con el TAB y otras células del sistema inmune forman un círculo negativo que perpetúa el estado pro-inflamatorio, favoreciendo la secreción de resistina (Wensveen, Valenti, Šestan, Wensveen, y Poli, 2015). La resistina cumple un papel importante en el desarrollo del proceso inflamatorio característico de la obesidad al estimular la producción de ERO y ERN y favoreciendo el estrés oxidativo (Laurikka y col., 2014). Aparte de esto, esta citocina induce la producción de otras proteínas del sistema inmune, ya sea a través del TLR-4 o de otras células del sistema inmune como los



monocitos, regulando la activación del NF-B en el adipocito, condición que indudablemente perpetúa el estado inflamatorio en obesidad (Codoñer-Franch y Alonso-Iglesias, 2015).

#### **1.2.4 ADIPOCITOCINAS Y ARTRITIS REUMATOIDE**

En base a lo descrito con anterioridad, las adipocitocinas presentan múltiples efectos sobre los mecanismos de regulación de la inflamación local y sistémica. En este contexto, se puede sugerir que los procesos autoinmunes, como la AR, podrían verse modificados por situaciones tan comunes como la obesidad o alteración de los niveles de adipocitocinas. De ahí que resulte interesante el estudiar la posible relación entre los niveles de las adipocitocinas y la actividad clínica de pacientes con AR.

A ese respecto, se han realizado varios estudios para evaluar la posible participación de las adipocitocinas (Tabla 3) en la AR, sin embargo, los resultados han sido muy heterogéneos e incluso controversiales. Mientras algunos grupos observaron una clara correlación entre el incremento del nivel de leptina/resistina con la actividad de la enfermedad, la predisposición a la cronicidad y respuesta al tratamiento convencional (faltan referencias), en otros estudios no se observó esta asociación (referencias). Entre los factores que pudieran ayudar a explicar la heterogeneidad de estos estudios se puede mencionar: el diseño de los estudios clínicos, la homogeneidad de los pacientes, el índice de masa corporal (IMC) de los pacientes, las diferencias geográficas y medioambientales de los sujetos, así como las diferencias técnicas en las determinaciones bioquímicas.

Todo esto resalta la importancia de parear las poblaciones de estudio, al tiempo de realizar una evaluación integral, tanto de la respuesta clínica como de los mecanismos de acción si queremos describir la posible asociación con los niveles de las adipocitocinas.

**TABLA 3.** Papel de las adipocitocinas en AR

Año	No.	Edad	Sexo	Proteína	BMI	DAS28	Duración	Conclusiones
1999	58 (55)	25-59	¿?	13.7± 9.4 (RIA)Leptina	25 vs 24 ctr	11.3 (>2.7) 17.8 (<2.7) [1.8-3.6]	9.5± 9.5	No diferencias entre controles y pacientes. Correlación con BMI
2003	76 (42)	64±12 (42±14)	48/28 (22/12)	6.2±1 (5.2±1.2)  (2±0.6)	--	Erosivo vs non-erosivo	14-8	Aumento significativo de leptina plasmática en pacientes. Menor leptina sinovial en pacientes, se sugiere su consumo
2005	68 (32)	9 (9)	43/25 (21/11)	7.8± 4.4 (8.6± 5.3)  RIA	17 (19)	--	--	No hay diferencias significativas entre controles y pacientes. Relación de leptina con edad y sexo
2005	38	47.6±2 (44.3±2)	20/18 (26/6)	14.3±1.9 (9.2±1.3)  RIA		--	8±7	Mayor nivel de leptina en pacientes aunque no fue significativa
2005	31 (18)	41±15 (38.4)	11/20 (9/9)	6 vs 4.2  15 vs 13.4	25 vs 23 H  26 vs 22 M	48% < 3.2  52% > 3.2	6.7 (1-11)	No hay diferencia significativa, ni cambio después de 2 sem. con anti-TNF
2006	31 (18)	46±14 (48±16)	22/9 (10/8)	33.9±7.3 (13.3±3)  ELISA	26±0.6 (24.3±0.8)	--	--	Diferencia significativa en niveles de leptina, adiponectina y Visfatina
2006	32		30/2	5±1	22.8±0.8	--	--	Tratamiento con adalimumab por 16 sem no modificó nivel de leptina
2006	50 (34)	56.3±12 (53±12)	41/9 (28/6)	53.2±37 (23±17)  ELISA	26.8±5.7 (25.8±3.6)	<5.1 (19)  >5.1 (31)	10±9	Nivel mayor de leptina en pacientes, pero no relaciona con actividad o con tratamiento (MTX, glucocortoides)
2007	41	49±12	33/8	3.91±6.1	24.2±3	--	6.7	No hay diferencia entre controles y pacientes

	(25)	(51±13)	(19/6)	(4.94±6.4) ELISA	(23.7±3)			
2007	50	40.7±10	Mujeres	14.2±11 (+active 7±3.4 (- activo)	<25 (20-22)	Alta active (4.8±0.9, 26)  Baja (2.4±0.7, 24)	0.1-3	Hay diferencia significativa entre pacientes activos y poco activos. El nivel de leptina baja tras 8-13 meses de tratamiento DMARD.
2007	30 (30 OA)	60.2±15	Mujeres	11.2±25	Ranks BMI	3.3-4.8 (15)  >4.8 (15)	2-35	No hay correlación entre leptina y BMI, edad, actividad. Posible relación con índice de Filtración Glomerular
2008	37	58.6±20	¿?	26.7 (M)  8.6 (H)  [5-35]	26.4±9	<5.1, 46%  >5.1, 54%	2-26	No hay relación entre nivel de leptina y actividad. Posible relación en pacientes >10 años
2010	40	46.8	35:5		22.1	4.8 ± 0.7	1.5 a 20	Los niveles de Leptina en suero y líquido sinovial fueron más altos en pacientes respecto a donadores y se estableció una correlación con el DAS28 Y CRP
2003	52	67.4- 73.9	39/13	2.2 µg/mL adiponectina	27.8	---	---	Entre pacientes con OAR Y AR, no hay diferencia entre los niveles.
2006	31	----	-----	-----	-----	----	---	Se encuentran en niveles elevados respecto a controles
2011	253	56.1 ± 15	68.8% mujeres	Vifastina y adiponectina	25.6 ± 3.5	-32.4 ± 10.1	1	Los niveles de IL-6, TNFα, visfatina, and adiponectina estuvieron asociados positivamente con daño radiográfico, por 4 años
2003	52	67.4- 73.9	39/13	resistina[74.6] ng/ml	27.8	---	-----	Hay correlación entre ESR y CRP. Se encontraba 10 veces más en pacientes con AR que en pacientes con OAR
2006	31	--	---	Resistina	----	----	---	Niveles iguales que en don

## 2 JUSTIFICACIÓN

La Artritis Reumatoide es una enfermedad de alta prevalencia mundial y en nuestro país, que, aunque no causa muerte, si incrementa su riesgo, además de que ocasiona el deterioro de la calidad de vida del paciente. A pesar que esta enfermedad se conoce desde hace muchos años, debido a su carácter multifactorial, es muy difícil poder precisar el conjunto de elementos necesarios para desencadenar el proceso autoinmune o su cronicidad. Todo esto ha dificultado la generación de procedimientos terapéuticos efectivos. En ese sentido, las propuestas farmacológicas actuales fundamentalmente controlan la respuesta inflamatoria de las células inmunes, atenuando solamente los síntomas, pero sin modificar sustancialmente los elementos desencadenantes. Por todo ello sería de gran importancia aportar nuevo conocimiento orientado en la elucidación de los mecanismos que pudieran intervenir en el desarrollo de esta enfermedad.

Por otro lado, en nuestro grupo de trabajo, se han realizado estudios donde observamos un aumento significativo de la leptina en la sangre y líquido sinovial de pacientes con AR, con respecto a donadores sanos. Así también, más recientemente, observamos que el incremento de leptina se acompañaba de un incremento de adiponectina, pero no de resistina. Adicionalmente, este último estudio incluyó la asociación entre estas adipocitocinas, la actividad clínica de los pacientes, los niveles de autoanticuerpos y los niveles de citocinas pro-inflamatorias (IL-17, TNF $\alpha$  e IL-6). En este último estudio se observó una correlación entre los niveles elevados de estas dos adipocitocinas con un mayor índice de actividad de la enfermedad. Cabe hacer notar que las poblaciones de pacientes incluidas en este estudio estuvieron controladas ya que tanto el grupo de donadores como el de pacientes fueron mayoritariamente mujeres con sobrepeso, de manera tal que el incremento en los niveles de adiponectina y leptina no podría explicarse por una variación en la proporción de grasa corporal, sino más bien sería respuesta a la actividad inflamatoria. En este estudio, también se observó que estas adipocitocinas parecías asociarse con etapas diferentes de la enfermedad temprana para la adiponectina y tardía para leptina. Asimismo, también observamos una correlación positiva de los niveles de leptina con la citocina pro-inflamatoria IL-17A, mientras que los niveles

mayores de adiponectina se asociaban de manera directamente proporcional con los niveles de TNF $\alpha$ , con Factor Reumatoide y anti péptidos citrulinados cíclicos ( $\alpha$ CCP).

La relación fisiológica entre leptina e IL-17, nos parece particularmente interesante, ya que hasta ahora, no hay evidencia clara de esta relación. En este sentido, su confirmación en un sistema controlado posibilitaría una gama de otros estudios para caracterizar la vía de regulación entre la leptina y una citocina pro-inflamatoria tan relevante en el área clínica como IL-17. Por otro lado, nuestra propuesta de que adiponectina tendría un papel pro-inflamatorio en la inflamación por artritis ha sido propuesto por otro grupo de investigación, lo que pondría en perspectiva un nuevo enfoque de estudio de esta adipocitocina.

Además de comprobar la potencial contribución clínica de las adipocitocinas en la AR, es fundamental caracterizar el efecto de cada una de estas moléculas sobre la respuesta celular de los linfocitos T, que son células de gran importancia en la enfermedad. De igual manera, el estudio de las adipocitocinas en el perfil inflamatorio ha sido caracterizado en gran medida en estas células inmunes, con el fin de poder sugerir nuevos blancos potencialmente terapéuticos en pacientes con AR.

En ese sentido, nuestro interés en el presente estudio se centra en evaluar los eventos de muerte celular, activación, proliferación y los perfiles de expresión de citocinas en linfocitos T derivados de sangre periférica (LTSP) y células mononucleares de sangre periférica (MN) inducidos por estas adipocitocinas. Además de obtener un perfil global de los efectos celulares y su actividad clínica.

### **3 HIPOTESIS**

H1: Las adipocitocinas (leptina y adiponectina) inducirán efectos diferenciales sobre la estimulación celular (activación y secreción de citocinas), la diferenciación y la supervivencia de células mononucleares y linfocitos T derivados de sangre periférica de donadores sanos y pacientes con AR.

H1o: Las adipocitocinas (leptina y adiponectina) no inducirán efectos diferenciales sobre la estimulación celular (activación y secreción de citocinas), la diferenciación y la supervivencia de células mononucleares y linfocitos T derivados de sangre periférica de donadores sanos y pacientes con AR.

H2: Los niveles séricos de las adipocitocinas leptina, adiponectina y resistina no se asociarán con los niveles de citocinas inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, e IL-17A), así como con la actividad clínica de pacientes con Artritis reumatoide.

H2o: Los niveles séricos de las adipocitocinas leptina, adiponectina y resistina se asociarán con los niveles de citocinas inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, e IL-17A), así como con la actividad clínica de pacientes con Artritis reumatoide.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Caracterizar el efecto *in vitro* de Leptina y Adiponectina sobre la respuesta celular (proliferación, activación, inducción de citocinas, diferenciación y muerte celular) en células mononucleares y linfocitos T derivados de sangre periférica de donadores sanos y pacientes con AR, así como evaluar la posible asociación de los niveles circulantes de las adipocitocinas, con citocinas pro-inflamatorias y actividad clínica de pacientes con AR.

### **4.2 Objetivos particulares**

- 1.- Evaluar el efecto de leptina y adiponectina sobre la proliferación de células, mononucleares y linfocitos T derivados de sangre periférica (LTSP).
- 2.- Evaluar el efecto de leptina y adiponectina sobre la muerte celular y sobrevivencia de células mononucleares y LTSP.
- 2.- Evaluar el efecto de leptina y adiponectina sobre los eventos activación de células mononucleares y LTSP.
- 4.- Evaluar el efecto de leptina y adiponectina sobre la diferenciación Th1/Th17 de LTSP.
- 5.- Evaluar los niveles séricos de las adipocitocinas leptina, adiponectina y resistina en pacientes con AR.
6. Evaluar los niveles séricos de las citocinas proinflamatorias: TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, e IL-17.
- 7.- Evaluar la asociación estadística entre los niveles de adipocitocinas, niveles de citocinas y actividad clínica de pacientes con AR.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Diseño del estudio.**

El estudio se dividió en dos partes: experimental (in vitro) y clínica (estudio transversal). Para la primera parte, las técnicas se estandarizaron con muestras celulares de donadores de banco de sangre, mientras que las células derivadas de pacientes con AR fueron empleadas en los ensayos in vitro. Por su parte, el estudio clínico implicó el reclutamiento de donadores y pacientes, la toma de una muestra de sangre en la visita basal y cuya evaluación analítica fue realizada de manera simultánea.

### **5.2 Colecta de muestras**

#### **5.2.1 Pacientes**

Las muestras de sangre de los pacientes con AR se reclutaron en dos centros hospitalarios: el Hospital General de Cuernavaca “José G. Parres” (2010-2014) y el Hospital General de México (2006-2008), en colaboración con los responsables del servicio de Reumatología, y en función de los criterios de inclusión y exclusión.

Los criterios de inclusión para este estudio fueron los siguientes:

1. Pacientes que hayan asistido a las consultas cotidianas en los hospitales citados.
2. Pacientes que hayan sido diagnosticados como AR, según los criterios del ACR/EULAR 20190.
3. Pacientes que hayan voluntariamente aceptado participar en el presente estudio y donar una muestra de sangre.
4. Pacientes que hayan voluntariamente aceptado determinar sus parámetros corporales: peso y talla.
5. Pacientes mayores de 18 años y sin otras enfermedades inflamatorias u obesidad mórbida.



6. Pacientes con AR que reciban un tratamiento a base de FARMES y cuyo tratamiento no haya sido modificado durante los últimos tres meses previos al estudio

Los criterios de exclusión para este estudio fueron:

- Pacientes embarazadas o en período post-menopaúsico

Los criterios de eliminación para este estudio fueron:

- Pacientes con muestras de sangre hemolizada o con resultados no consistentes entre las repeticiones.
- Pacientes con expedientes clínicos incompletos.

### **5.2.2 Donadores.**

Las muestras sanguíneas de donadores fueron obtenidas con colaboración del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea (CETS) de Morelos. Con el fin de comparar grupos de individuos con características semejantes, se seleccionaron sólo aquellos donadores que cumplieron con las siguientes características: a) Asistir al CETS al servicio de donación de sangre; b) Aceptar voluntariamente participar en el presente protocolo de investigación; c) Ser de género femenino y con edad entre 30 y 60 años; d) Estar sana y ser negativa para las pruebas básicas para la donación de sangre (VIH, Hepatitis, Herpes, Brucella, etc.); e) No cursar con enfermedades inflamatorias.

Las muestras de sangre de los pacientes se obtuvieron el mismo día de la consulta y evaluación clínica de cada paciente, valoración que fue almacenada en una base de datos única y con acceso electrónico por parte de los colaboradores (<http://www.zoho.com>).

La toma de sangre se realizó en vacutainer/EDTA estériles y, el mismo día, se aisló el plasma y las células mononucleares. Para su separación en condiciones de esterilidad, la sangre se traspasó a tubos de 15 ml estériles, y se centrifugaron durante 7 minutos a 1,500 rpm (300 g) a temperatura ambiente. Se hicieron alícuotas del plasma y se almacenaron a -80° hasta su análisis, permitiendo generar un banco de plasmas sanguíneos para el estudio de las

citocinas, así como de los marcadores de la enfermedad (anti-PCC, factor Reumatoide). Con el fin de evitar la contaminación de las muestras una vez descongeladas, se añadió 0.01% de  $\text{NaN}_3$  previo a su almacenamiento a 4°C.

Por otra parte, las células derivadas de las muestras sanguíneas de los donadores sanos y pacientes se purificaron según viene descrito más adelante.

### **5.3 Línea celular.**

Para los ensayos de estandarización de las técnicas de activación, proliferación y muerte celular se empleó la línea celular Jurkat E6-1, la cual deriva de un linfoma humano y presenta características similares a los linfocitos T. Estas células fueron mantenidas en el medio RPMI 1640 Advanced (Invitrogen), el cual es suplementado con el 3% de Suero Fetal Bovino (SFB), (Invitrogen), el 1% de Antibiótico (estreptomina, penicilina, Invitrogen) y 1% de L-Glutamina (Invitrogen). Las células fueron incubadas a una temperatura de 37° C con 95/5% de aire/ $\text{CO}_2$ , en una incubadora Nuair US AUTOFLOW  $\text{CO}_2$  water/Jacket. Durante todos los ensayos se mantuvo una viabilidad cercana o superior al 95%, lo cual garantiza la reproducibilidad de los ensayos.

### **5.4 Purificación de células mononucleares derivada de sangre periférica.**

Para la purificación de la fracción de células mononucleares, la sangre del donador sano se diluyó en una relación 1:1 con PBS estéril. A continuación y de forma separada, en tubos Falcón estériles, se agregaron 10 ml de Ficoll-Paque (Invitrogen) y, posteriormente, se agregó la sangre diluida hasta alcanzar un volumen final de 35ml. Posteriormente se centrifugó la sangre a 1250 rpm durante 50 minutos a temperatura 10°C sin freno. A continuación, se extrajo el anillo de células leucocitarias y se colocó en un nuevo tubo de centrifugación estéril. Posteriormente, estas células se lavaron 2 veces con PBS a 1500 rpm durante 6 minutos. Finalmente, el número y viabilidad celular fue determinado por la técnica de azul tripano y las células resultantes fueron mantenidas en medio RPMI Advanced (3% de Suero Fetal Bovino

(SFB), (Invitrogen), el 1% de Antibiótico (estreptomina, penicilina, Invitrogen) y 1% de L-Glutamina (Invitrogen), incubadas a una temperatura de 37°C con 95/5% de aire/CO<sub>2</sub>, en una incubadora Nuair US AUTOFLOW CO<sub>2</sub> water/Jacket).

### **5.5 Purificación de linfocitos CD4<sup>+</sup>.**

Para la evaluación de los ensayos de apoptosis, proliferación y diferenciación, se purificaron los linfocitos T CD4<sup>+</sup> mediante el kit biotech # 130-096-533. Inicialmente, las células mononucleares (CMN) derivadas de sangre periférica de pacientes fueron aisladas como se indica arriba. Posterior a esta separación, las CMN fueron lavadas y, a continuación, se bloquearon con suero fetal bovino al 2% por 30 minutos a 4°C. A continuación, el botón celular obtenido de la centrifugación a 1250 rpm, se resuspendió en PBS y se incubó con el cocktail de anticuerpos del kit durante 30 minutos. Posteriormente, a las células incubadas, se les agregó un buffer que contenía, PBS, 1%, BSA al 0.5% y 2 mM de EDTA y se incubaron una vez más, en refrigeración 5 minutos más. A continuación, se agregó el cocktail con las perlas magnéticas, las cuales identifican a las células CD4<sup>+</sup> T, se procedió a incubación por 30 minutos en refrigeración. Después, se realizó la separación magnética, en donde, las columnas (columna de separación CS, Cat 130042401) previamente se prepararon con 3ml del buffer antes mencionado, y se eluyeron, las células a las cuales se les incubó con las perlas magnéticas, para finalmente lavar la columna y obtener los Linfocitos CD4<sup>+</sup> purificados. Finalmente, para verificar la purificación, las células eluidas fueron evaluadas para los marcadores de superficie CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Biolegend Anti-human CD3 PE-Cy5/CD4 PE/CD8 FITC Cocktail cat #319001) y analizado citometría de flujo. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> purificados fueron mantenidos en medio RPMI Advanced (3% de Suero Fetal Bovino (SFB), (Invitrogen), el 1% de Antibiótico (estreptomina, penicilina, Invitrogen) y 1% de L-Glutamina (Invitrogen), hasta la realización de los experimentos *in vitro*.

## 5.6 Ensayos de proliferación celular

Para el análisis de eventos de proliferación se utilizaron tanto células mononucleares (CMN) derivadas de sangre periférica de donadores sanos como linfocitos T CD4<sup>+</sup> purificados. Para la evaluación de la capacidad proliferativa se empleó la técnica de MTT, donde se empleó el reactivo MTS (Promega), lo cual permite la generación de formazán en las células metabólicamente funcionales sin los ciclos de lavado que pueden favorecer la pérdida de células y, por ende, alteración de los resultados. En ensayos preliminares se valoró que 1x10<sup>4</sup> células por pozo (200 µl de volumen final), permitían un desarrollo de color por debajo de un valor de DO<sub>490 nm</sub> saturante. En este sentido, los ensayos de estimulación se realizaron en idénticas condiciones a las descritas arriba, salvó que 4 horas previas al tiempo de incubación, se adicionaron 100 µl de la solución de MTS por pozo de una caja de 96 pozos y se permitió que continuara la incubación. Finalmente, al tiempo de cosechar, la reacción se detuvo por la adición de SDS al 10% y se determinó la DO<sub>490nm</sub> pocos minutos después en un lector de placas Ultramark (Bio Rad).

## 5.7 Determinación de marcadores de activación: CD69, CD25 y CD45

Para la determinación de los marcadores de activación CD25 y CD69, 1x10<sup>6</sup> células CMN de donadores fueron estimuladas en experimentos en paralelo con: a) PHA a [1 µg/ml]; b) Leptina [50 ng/ml] y c) adiponectina [2.5 ng/ml] por 24 hrs. Una vez transcurrido cada tiempo de incubación, las células se lavaron y se les agregó una solución de fijación con suero al 2% por 30 minutos a 4°C. A continuación, el botón celular obtenido tras su lavado y centrifugación se resuspendió en una solución de bloqueo en presencia de los anticuerpos α-CD25-FICT (1:800, cat 304D11) y α-CD69\_PE (1:800, cat 316904) o CD45 y se incubó por 30 minutos en hielo. Posteriormente, se volvieron a lavar para eliminar el pegado inespecífico y se fijaron con PFA al 2% y se almacenaron a 4C y en la obscuridad hasta su posterior análisis por citometría de flujo.

## 5.8 Determinación de la activación DE STAT3.

Para la determinar la activación de la vía de STAT3, evaluamos los niveles de fosforilación de STAT3 por la técnica de western blot de las células mononucleares tras su incubación con leptina recombinante a una concentración de 25 [ng/ml] por 3 hrs. Para su evaluación se empleó el sistema de SDS-PAGE/WESTERN, empleando geles de poliacrilamida al 8 % y una cámara Miniprotean 3 Cell (BIO-RAD). Previo a la electroforesis, la concentración de proteína de los lisados celulares se determinó por el método de Bradford, empleando albúmina (BSA) (AMRESCO) para la curva patrón y en ensayos por duplicado.

En base a experimentos preliminares y de acuerdo a trabajo previo del grupo de investigación, se ajustó la cantidad de proteína total a 30 µg por carril y por condición. En este sentido, el volumen correspondiente a 30 µg de proteína fue desnaturalizado en “sample buffer” (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, glicerol al 4%, SDS 10%, azul de bromofenol 0.5% w/v y 0.05% β-mercaptoetanol) y las muestras se calentaron por 5 min a 95°C por 5 minutos en un baño seco (Barnstead/Termolyne). Las muestras se corrieron a 40 mA constante utilizando la fuente de poder EPS 301 (Amershan Pharmacia Biotech).

Seguido a esto, las proteínas contenidas en el gel se transfirieron a membrana de nitrocelulosa 0.2 mM (BIO-RAD), en las condiciones recomendadas por el proveedor. A continuación, la membrana de nitrocelulosa se incubó por una hora con el buffer de bloqueo con leche descremada (TBS, 0.05% Tween20, 5% w/v leche descremada) o con una solución de bloqueo con albúmina (BSA al 1% en TBS/Tween 0.05%). Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS/Tween20 (0.05%) y las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C, con los diferentes anticuerpos primarios (Santa Cruz Biotechnology): 1) α-actina (sc-1615), 2) STAT3 (sc-8059), 3) p-STAT3(sc-482), diluidos en la solución de bloqueo. Al día siguiente, las membranas se lavaron con la solución TBS/Tween-20 3 veces durante cinco minutos cada uno y a continuación se incubaron por 1 hr con el anticuerpo secundario correspondiente: a) anti-ratón (Santa cruz Biotechnology sc-2005), b) anti-conejo (abcam, ab 7083), c) anti-cabra (Santa cruz Biotechnology sc-2354), todos los

anticuerpos secundarios acoplados a la proteína peroxidasa de rábano (HRP). Finalmente, después de los lavados con TBS/Tween-20, las membranas se incubaron por 1 min con reactivo Western lightning chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer) y la imagen de quimioluminiscencia fue obtenida en una cámara ChemiDoc XRS (BIORAD). Los análisis densitométricos fueron realizados con el software Quantity One v.4.5.1 (Bio Rad), empleando la misma área en mm<sup>2</sup> para la comparación de píxeles. En todos los casos, se evaluaron 2-3 ensayos independientes y los resultados se presentaron como el media  $\pm$  desviación estándar.

### **5.9 Evaluación de la inducción de la expresión de ROR $\gamma$ T.**

Para la determinación de la inducción del factor de transcripción ROR $\gamma$ T, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> fueron incubados con leptina (50 ng/ml) por 7 días; cada tercer día las células recibieron el estímulo con la adipocitocina. Por otro lado, a manera de control, se estimularon linfocitos CD4<sup>+</sup> para promover una respuesta TH17, con IL-6, IFN $\gamma$ , y TGF $\beta$ . La evaluación se hizo por la técnica de SDS-PAGE/WESTERN, en geles de poliacrilamida al 8 % y empleando una cámara Miniprotean 3 Cell (BIO-RAD). Previo a la electroforesis, se determinó la concentración de proteína de los lisados celulares y se cargaron 30  $\mu$ g de proteína total por condición, como se describe antes. Asimismo, las muestras se calentaron por 5 min a 95 °C en “sample buffer” en un baño seco (Barnstead/Termolyne) y los geles se corrieron a 40 mA de corriente constante utilizando la fuente de poder EPS 301 (Amershan Pharmacia Biotech).

Seguido a esto, las proteínas contenidas en el gel se transfirieron a membrana de nitrocelulosa 0.2 mM (BIO-RAD), en las condiciones recomendadas por el proveedor. A continuación, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó por una hora con la solución de leche descremada (TBS, 0.05% Tween20, 5% w/v leche descremada) o con una solución de albúmina (BSA al 1% en TBS/Tween 0.05%). Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con TBS/Tween20 (0.05%) y las membranas se incubaron durante toda la noche a 4°C, con los diferentes anticuerpos primarios: 1)  $\alpha$ - actina (sc-1615), 2) ROR $\gamma$ T (biolegend), diluidos en la solución de bloqueo.

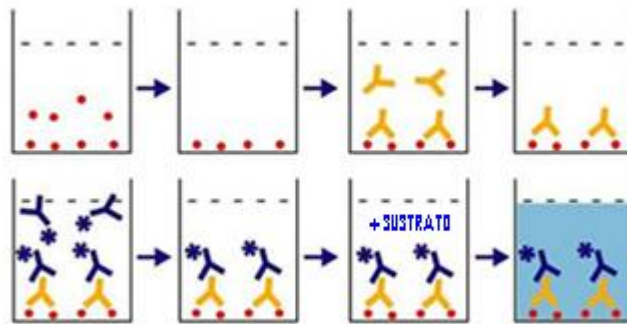
Al día siguiente, las membranas se lavaron con la solución TBS/Tween-20 3 veces durante cinco minutos cada uno y, a continuación, se incubaron por 1 hr con el anticuerpo secundario correspondiente: a) anti-cabra (Santa cruz Biotechnology sc-2354) anti-ratón (Santa cruz Biotechnology sc-2005), todos los anticuerpos secundarios acoplados a la proteína peroxidasa de rábano (HRP). Finalmente, después de los lavados con TBS/Tween-20 3 veces, las membranas se incubaron por 1 min con reactivo Western lightning chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer) y la imagen de quimioluminiscencia fue obtenida en una cámara ChemiDoc XRS (BIORAD). Los análisis densitométricos fueron realizados con el software Quantity One v.4.5.1 (Bio Rad), empleando la misma área en mm<sup>2</sup> para la comparación de pixeles. En todos los casos, se evaluaron 3 ensayos independientes y los resultados se presentaron como el media ± desviación estándar

#### **5.10 Determinación de resistencia a la muerte celular**

Para la determinación de la muerte celular,  $1 \times 10^6$  células CMN fueron incubadas, en paralelo, con diferentes tratamientos durante un período de 24 hrs: a) etopósido; b) leptina c) adiponectina d) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; e) galectina. Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, las células fueron lavadas 3 veces y se les agregó un buffer de unión a una concentración celular de  $10^6$  células/ml, se agregaron 5 ml de una dilución 1:2000 de YO-PRO (Molecular Probes-Invitrogen) y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad durante 20-30 minutos. Posteriormente, se agregaron 400 µl de la solución de unión y 5 µl de la dilución 1:400 de ioduro de Propidio (Molecular Probes-Invitrogen), inmediatamente después, las células fueron analizadas por citometría de flujo, registrando el canal de FITC para el registro de YO-PRO, mientras que el canal de PE se empleó para el registro de ioduro de propidio.

### 5.11 Optimización de protocolos de cuantificación por ELISA.

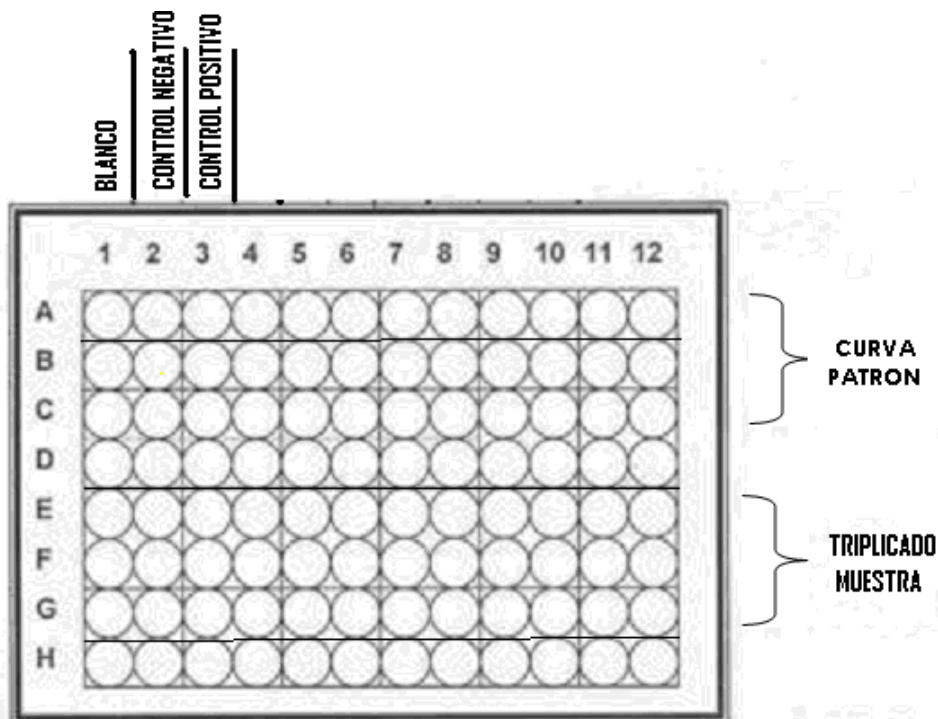
En este estudio se utilizó la técnica de ELISA para determinar los niveles de Leptina, Adiponectina, Resistina, IL-2, IL-17, IL-6 y TNF $\alpha$  en el plasma en donadores y pacientes con AR. El principio de la técnica es mostrado en la Figura 14.



**Figura 14. Protocolo general de la técnica de ELISA.** Inicialmente, se incuba la placa de 96 pozos con la dilución de plasma, permitiendo el acoplamiento, entre otras, las citocinas en estudio (representado por puntos rojos). Posteriormente, se bloquea los espacios no ocupados por las citocinas. A continuación, se incuba con el anticuerpo específico de la citocina en cuestión (en amarillo) y se lava el exceso de anticuerpo. Luego se agrega un anticuerpo secundario acoplado con la enzima HRP (asterisco azul). Finalmente, se agrega el sustrato de la enzima, lo cual genera un cambio de color, que puede cuantificarse en el lector de ELISA.

En la Figura 15 se esquematiza el diseño general de los ensayos por ELISA empleados para la evaluación de todas las muestras plasmáticas. El volumen para cada pozo fue de 100  $\mu$ l.





**FIGURA 15. Diseño general de los ensayos para cuantificación de citocinas por ELISA.** Se muestra la región reservada para la curva estándar y los pozos destinados en las muestras plasmáticas.

### 5.11.1 Pre-Incubación

A los pozos A a C de la columna 1 (Figura 15), se le agregó 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaHCO}_3$  y fueron considerados como el blanco del sistema. El control negativo (pozos A, B y C de la columna 2) estuvo constituido por plasma control en presencia de anticuerpo irrelevante (Un anticuerpo con el que se asegurara que no hubiera un falso positivo). Por su parte, en el control positivo se utilizó el plasma control, correspondiente a una muestra de donador, en presencia del anticuerpo específico. Con el fin homogeneizar los resultados entre placas, se conservó el mismo plasma control para todos los ensayos. Asimismo, la curva patrón sirvió para estandarizar los resultados generales. Finalmente, las muestras de donadores y pacientes se distribuyeron en el resto de los pozos (D-H, 1-12), en ensayos por triplicado. Una vez que se adicionaron las muestras de plasma, se selló la caja con plástico y se almacenó durante toda la noche a 4°C.

Para cada determinación se emplearon ensayos por triplicado, donde el resultado de cada muestra correspondió al promedio  $\pm$  desviación estándar. La concentración de las citocinas fue determinada por la interpolación en curva patrón.

### **5.11.2 Bloqueo y primer anticuerpo**

Posteriormente a la incubación en frío, se lavaron las placas 3 veces con 200  $\mu$ l de amortiguador de lavado (PBS, Tween-20 0.05%). Después de cada lavado se removió el exceso de amortiguador, golpeando la placa sobre un papel absorbente. A continuación, se bloquearon los pozos por la incubación con 100  $\mu$ l/pozo de una solución de leche descremada al 5% en buffer de lavado (amortiguador de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Al finalizar la incubación, se volvieron a lavar las placas 4 veces con buffer de lavado. Posteriormente, se agregaron 100  $\mu$ l de una solución del anticuerpo específico para la citocina (primer Anticuerpo), (véase Resultados) en la solución del amortiguador de bloqueo. El primer anticuerpo se incubó durante una hora a temperatura ambiente.

### **5.11.3 Anticuerpo secundario**

A continuación, los pozos se lavaron 4 veces con el amortiguador de lavado y, después, se adicionó la solución del anticuerpo secundario, los cuales se encuentra acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP). De igual forma que el primer anticuerpo, la solución del segundo anticuerpo se hizo con amortiguador de bloqueo y se agregaron 100  $\mu$ l de esta solución en cada pozo, donde se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

### **5.11.4 Revelado**

El siguiente paso consistió en incubar con 100  $\mu$ l de ABTS (Sigma) por 40 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se determinó la densidad óptica (DO) de los pozos correspondientes a la curva estándar y las muestras de pacientes en el espectrofotómetro Epoch (formato de placas) a 405 nm, con corrección de 650 nm de longitud de onda.

## **5.12 Evaluación de niveles plasmáticos de adipocitocinas y citocinas.**

### **5.12.1 ELISA para Leptina**

Para la determinación de los niveles de leptina, se realizaron ensayos con diferentes diluciones de plasma, concluyendo que la mejor condición fue que la dilución de plasma sanguíneo nos dio las mejores lecturas fue de 1:8000. Por eso, para todos los ensayos de determinación de leptina se agregaron 100  $\mu$ l de plasma 1:8000 en buffer de  $\text{NaHCO}_3$ . Tanto los plasmas de donadores como de pacientes fueron diluidos de igual manera para determinar los niveles de leptina en sangre.

Como se explicó en el protocolo general (arriba), las muestras de plasma fueron incubadas durante toda la noche a 4°C en la placa de 96 pozos. Posterior al período de bloqueo, se adicionó como primer anticuerpo ObA-20 (rabbit polyclonal IgG 200  $\mu$ g/ml, Santa Cruz Biotech) a una dilución de 1:800 en solución con leche descremada, y se incubó en cada pozo de la placa durante 1 hora. A continuación, tras los lavados en solución de PBS-Tween-20, se adicionó como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo-HRP (Santa Cruz) a una dilución final de 1:500 en leche al 5% en PBS-Tween-20. La reacción colorida y su evaluación se realizó en las condiciones descritas en la sección anterior.

Para la determinación de la concentración de leptina, se estableció una curva patrón con leptina recombinante humana (Sigma. Cat: 195807, Lot: 6424H 500 UG.) con concentraciones crecientes desde 10 hasta 60 ng. De esta curva se obtuvieron las siguientes constantes:  $m=0.001175$  y  $b=0.0218$ , ( $n=3$ ).

### **5.12.2 ELISA para Adiponectina**

En el proceso de estandarización, se observó que la dilución de plasma 1:25,000 en amortiguador de carbonatos pH 9.3 nos dio resultados reproducibles y sensibles. Por su parte, el primer anticuerpo empleado fue anti-Acrp30 (goat policlonal IgG 200  $\mu$ g/ml, clona G17, Santa Cruz Biotech). Este anticuerpo se empleó a una dilución de 1:1000 en leche al 5% en PBS-

Tween-20, y se adicionaron 100  $\mu$ l de la solución en cada pozo de la placa durante 1 hora. Posteriormente, tras los lavados en solución de PBS-Tween-20, se adicionó el anticuerpo secundario correspondiente a anti-IgG de cabra-HRP (Santa Cruz Biotech) a una dilución final de 1:1000 en leche al 5% en PBS-Tween-20 finalmente, se reveló con ABTS.

Para la determinación de la concentración de Adiponectina, se estableció una curva patrón con Adiponectina recombinante humana (PeproTech. No. Cat. 450-24. Lot 1107331k2007) con concentraciones crecientes de 1 hasta 10 ng. De esta curva se obtuvieron las siguientes constantes:  $m= 0.04542$  y  $b= 0.0899$  ( $n= 3$ ) y nivel de sensibilidad:

### **5.12.3 ELISA para Resistina.**

Para la determinación de los niveles de esta citocina, se observó que la dilución de plasma 1:50,000, nos dio resultados reproducibles y sensibles. Para lo cual se agregaron 1  $\mu$ l de plasma en 12.5 ml de  $\text{NaHCO}_3$ , seguida de una dilución en cantidades equitativas (700  $\mu$ l de dilución de suero:700  $\mu$ l de  $\text{NaHCO}_3$ ), para obtener una dilución de 1:25,000, de igual forma se hizo la siguiente dilución, la cual nos permitió llegar a la dilución deseada, 1:50000. Tanto los plasma de donadores y pacientes fueron diluidos exactamente igual para determinar los niveles de resistina en sangre. Como se explicó antes, las muestras de plasma fueron incubadas durante toda la noche a 4°C, para posteriormente, lavar con el buffer de lavado y bloquear en solución de leche descremada al 5% en PBS-Tween-20. El primer anticuerpo (anti-resistina, mouse monoclonal IgG<sub>1</sub> 200  $\mu$ g/ml) se preparó a una dilución de 1:1000 en leche al 5% en PBS-Tween-20, y se agregaron 100  $\mu$ l de la solución en cada pozo de la placa durante 1 hora. Posteriormente, tras los lavados en solución de PBS-Tween-20, se adicionó el anticuerpo secundario (anti-IgG de mouse-HRP, Santa Cruz Biotech) a una dilución final de 1:1000 en leche al 5% en PBS-Tween-20 a una dilución final de 1:1000 en leche al 5% en PBS-Tween-20. Finalmente, se reveló con ABTS.

Como se mencionó en el protocolo para ELISA indirecta se obtuvo una reacción la cual fue leída a través del lector de placas de ELISA, para posteriormente realizar su análisis. Para

la determinación de la concentración, se preparó una curva patrón con Resistina recombinante humana (PeproTech. Cat.# 450-19. Lot# 0604235 D3007) con concentraciones crecientes de 0.1 hasta 2ng. De esta curva se obtuvieron las siguientes constantes:  $m = 0.07621$  y  $b = 0.08905$  ( $n = 3$ ) y nivel de sensibilidad.

#### **5.12.4 ELISA para TNF $\alpha$ .**

Para la determinación de los niveles de esta citocina, en pacientes con AR y donadores se empleó una dilución de 1:6,000 del plasma. Para lo cual se agregaron 1  $\mu$ l de plasma en 12.5 ml de  $\text{NaHCO}_3$ , seguida de dos diluciones seriadas (700  $\mu$ l de dilución de suero:700  $\mu$ l de  $\text{NaHCO}_3$ ). Tanto los plasmas de donadores y pacientes fueron diluidos exactamente igual para determinar los niveles en sangre. En este caso, el primer anticuerpo (anti-TNF- $\alpha$ , goat polyclonal IgG 200  $\mu$ g/ml) se preparó a una dilución de 1:600 en leche al 5% en PBS-Tween-20, y se agregaron 100  $\mu$ l de la solución en cada pozo de la placa durante 1 hora. Posteriormente, tras los lavados en solución de PBS-Tween-20, se adicionó el anticuerpo secundario (Donkey anti-IgG de goat-HRP, Santa Cruz) a una dilución final de 1:1000 en leche al 5% en PBS-Tween-20. Finalmente, se reveló con ABTS.

Para la determinación de la concentración, se preparó una curva patrón con TNF- $\alpha$  recombinante humana (PeproTech. No: Cat.# 300-01A. Lot# 0604CY25 K155) con concentraciones crecientes de 1 hasta 8 ng. De esta curva se obtuvieron las siguientes constantes:  $m = 0.1844$  y  $b = 0.09172$  ( $n = 3$ ) y nivel de sensibilidad.

#### **5.12.5 ELISA para IL-2.**

Se preparó una curva de calibración empleando IL-2 recombinante (Santa Cruz Biotech) desde 0.1 hasta 9 ng/ml en  $\text{NaCO}_3$ , pH 9.6. Los sobrenadantes de cultivo fueron resuspendidos en  $\text{NaCO}_3$  en una dilución 1:1. La curva y los sobrenadantes se colocaron en una placa de 96 pozos y se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron 1 vez con PBS-Tween

0.05% y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de leche descremada. Posteriormente, se lavaron los pozos dos veces con PBS-Tween 0.05% y se incubaron por 1 hora a TA con anticuerpo primario  $\alpha$ -IL-2 (Santa Cruz Biotech, clone F-13), diluido 1:1000 en solución de bloqueo. Posterior a sus lavados con PBS-Tween 0.05%, se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con  $\alpha$ -IgG goat-HRP (Jackson), diluido 1:1000 en solución de bloqueo. Finalmente, se lavaron los pozos 2 veces con PBS-Tween 0.05% y se incubaron por 1 hora con ABTS (MilliPore). Finalmente, la placa se determinó la  $DO_{405nm}$ . Se determinó la concentración de los sobrenadantes utilizando la regresión lineal de la curva de calibración. FALTA ALGO COMO ESTO: De esta curva se obtuvieron las siguientes constantes:  $m = 0.1844$  y  $b = 0.09172$  ( $n = 3$ ) y nivel de sensibilidad:

#### **5.12.6 ELISA para IL-6.**

Para la determinación de los niveles de esta citocina, en pacientes con AR y donadores se empleó una dilución de 1:6,000 del plasma. Para lo cual se agregaron 1  $\mu$ l de plasma en 6 ml de  $NaHCO_3$ . Tanto los plasmas de donadores como de pacientes fueron diluidos de igual manera para determinar los niveles de IL-6 en sangre.

Como se explicó en el protocolo general (arriba), las muestras de plasma fueron incubadas durante toda la noche a  $4^{\circ}C$ , para su absorción al plástico. Al día siguiente, se lavaron los pozos con solución de lavado y se bloqueó con solución de leche descremada al 5% en PBS-Tween-20.

El primer anticuerpo (anti IL-6, mouse policlonal IgG 200  $\mu$ g/ml, Santa Cruz Biotech) se preparó a una dilución de 1:800 en solución de bloqueo (leche descremada al 5% en PBS-Tween-20) y se agregaron 100  $\mu$ l de la solución en cada pozo de la placa durante 1 hora. Posteriormente, tras los lavados en solución de PBS-Tween-20, se adicionó el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo-HRP, Santa Cruz) a una dilución final de 1:1000 en solución de bloqueo. Finalmente, se reveló con ABTS.

Para la determinación de la concentración de IL-6, se preparó una curva patrón con IL-6 Recombinante humana (Prepotech Sigma. Cat: 200-06 Lot: 0203B16 F2508.) con

concentraciones crecientes de 0.1 hasta 6 ng. De esta curva se obtuvieron las siguientes constantes:  $m = 0.001175$  y  $b = 0.0218$ , ( $n = 3$ ).

### **5.12.7 ELISA para IL-17.**

Para la determinación de los niveles de esta citocina, en pacientes con AR y donadores se empleó una dilución de 1:8,000 del plasma, para lo cual se agregaron 1  $\mu$ l de plasma en 8 ml de  $\text{NaHCO}_3$ . Tanto los plasmas de donadores como de los pacientes fueron diluidos de igual manera para determinar los niveles de la citocina en sangre.

Como se explicó en el protocolo general (arriba), las muestras de plasma fueron incubadas durante toda la noche a  $4^\circ\text{C}$ , para su absorción. Al día siguiente, se lavaron los pozos con solución de lavado y se bloqueó con solución de leche descremada al 5% en PBS-Tween-20.

El primer anticuerpo ( $\alpha$  IL-17, rabbit policlonal IgG 200  $\mu\text{g/ml}$ ) se preparó a una dilución de 1:800 en solución de bloqueo (leche descremada al 5% en PBS-Tween-20), se agregaron 100  $\mu$ l de la solución a los pozos y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, tras los lavados en solución de PBS-Tween-20, se adicionó el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo-HRP, Santa Cruz Biotech) a una dilución final de 1:500 solución de bloqueo. Finalmente, se reveló con ABTS.

Para la determinación de la concentración de IL-17, se preparó una curva patrón con IL-17 humana (Peprotech. Cat:200-17 Lot: 03284) con concentraciones crecientes de 1 hasta 32 ng. De esta curva se obtuvieron las siguientes constantes:  $m = 0.005273$  y  $b = 0.1522$   $n = 3$ .

## **5.13 Evaluación clínica**

La valoración clínica de los pacientes se realizó en base a los criterios internacionales (ACR1987), de acuerdo al índice de actividad conocido como DAS28, el cual es internacionalmente empleado en el campo de la reumatología clínica por que describe las alteraciones inflamatorias y dolorosas de 28 articulaciones representativas del paciente con AR; al tiempo que considera una evaluación de laboratorio (velocidad de sedimentación globular). Esta evaluación fue realizada con la

colaboración por el Dr. Daniel Xibille, encargado del Servicio de Reumatología del Hospital General de Cuernavaca “José G. Parres” para todos los pacientes.

#### **5.14 Análisis estadístico**

Se empleó estadística descriptiva con media y desviación estándar de 3 experimentos independientes, para el estudio in vitro. Para la determinación de diferencias entre grupos se empleó la prueba de Mann Whitney para variables continuas y sin distribución normal. Para los análisis de correlación entre adipocitocinas, citocinas y actividad clínica, se empleó la prueba de Spearman, considerando como significativa una  $p < 0.05\%$ . Los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa estadístico Prism v.5.0.1 y v.7.0.1 (GraphPad Inc.).



## 6. RESULTADOS

### 6.1. Estudio *in vitro*

#### 6.1.1. Generalidades de donadores y pacientes

En la caracterización de los marcadores celulares y su relación con las adipocitocinas se emplearon muestras derivadas de 30 pacientes con AR y 30 donadores sanos. Como se puede ver en la Tabla IV, tanto en pacientes como donadores, fue mucho más frecuente el género femenino y en promedio era individuos con sobrepeso; sin embargo, estadísticamente los dos grupos fueron similares. Al comparar la edad de los individuos observamos que el grupo de pacientes fue significativamente mayor que el grupo de donadores.

**Tabla 4.-**Datos generales de donadores sanos y pacientes.

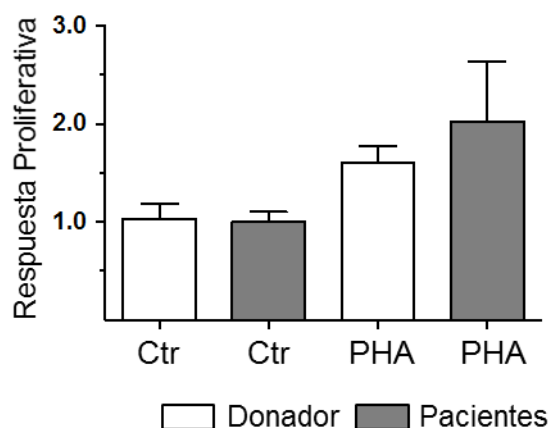
	<b>Pacientes (n = 30)</b>	<b>Donadores (n = 30)</b>	<b>P</b>
<b>Género (F/M)</b>	28/2	25/5	--
<b>Edad(DE<sup>a</sup>)</b>	42 (11.0)	33.9 (8.74)	<0.0532
<b>IMC<sup>b</sup>(DE)</b>	27.7 (3.92)	28.2 (4.21)	Ns
<b>DAS28 (DE)</b>	4.12 (1.22)	----	--
<b>Leptina [ng/ml] (DE<sup>a</sup>)</b>	0.20 (0.059)	0.27 (0.06)	< 0.0001
<b>Adiponectina [ng/ml (DE)]</b>	144.9 (80.24)	95.37 (19.42)	<0.05

. <sup>a</sup>Desviación estándar; <sup>b</sup>,IMC, Índice de masa corporal.

Por su parte, los pacientes en promedio tuvieron un índice de actividad promedio de 4.12 (DAS28), que supone una actividad moderada, de acuerdo a la clasificación del ACR/EULAR, 2010. Como se discutirá en la segunda parte de este estudio, también las muestras plasmáticas de estos individuos se emplearon para valorar las concentraciones de leptina y adiponectina.

Como se puede observar, los niveles fueron significativamente diferentes entre ambos grupos, pudiendo resaltar que los niveles de leptina fueron mayores en los donadores, en comparación con los pacientes y esto, para ser contrario, a los resultados de la segunda parte de este estudio (ver Discusión).

### 6.1.2. Efecto sobre la proliferación celular

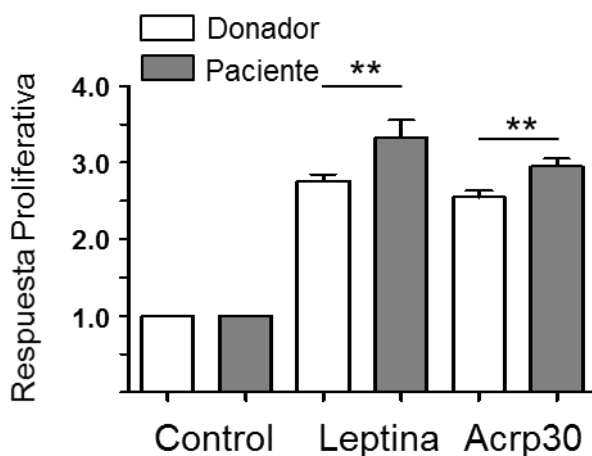


**Figura 16.- Inducción de la proliferación por efecto de tratamiento de PHA sobre células mononucleares derivadas de sangre periférica de donadores y pacientes.**  $1 \times 10^4$  células CMN de donadores y pacientes fueron incubadas por 48 hrs de PHA [10  $\mu\text{g/ml}$ ]. Posteriormente, se empleó la técnica de MTT y se determinó la OD490nm de los controles y los tratamientos (ver Metodología). Debido a la heterogeneidad de las lecturas, se determinó para Respuesta proliferativa como el cociente entre la OD490nm del control y el experimental. Las barras blancas corresponden a los donadores, mientras que las barras grises corresponden a los pacientes. Se presentan las medias y desviaciones estándar de 6 ensayos independientes.

En la Figura 16 podemos observar que la incubación con de PHA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) induce de manera significativa la proliferación de las células CMN tanto de donadores como pacientes con AR.

En la Figura 17 se observa, en el mismo sistema experimental, la incubación con leptina o adiponectina ocasionó una fuerte inducción de la proliferación de las células CMN tanto de donadores como de pacientes, en relación con el efecto obtenido con PHA. Un aspecto que nos interesa resaltar es el hecho de que el efecto proliferativo relativo fue estadísticamente mayor

para las células CMN derivadas de pacientes con AR, en comparación con aquellas derivadas de donadores ( $p < 0.01$ ); lo cual parece sugerir que las células de los pacientes muestran mayor sensibilidad a estimulación de la proliferación.

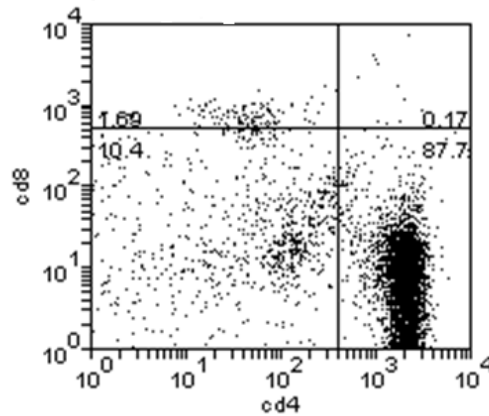


**Figura 17.-Efecto proliferativo de tratamiento de leptina y adiponectina sobre células CMN de donadores y pacientes con AR.**  $1 \times 10^4$  células CMN de donadores y pacientes fueron incubadas por 48 hrs de leptina (50 [ng/ml]), adiponectina (2.5 [ng/ml]). Posteriormente, se empleó la técnica de MTT y se determinó la OD<sub>490nm</sub> de los controles y los tratamientos (ver Metodología). Debido a la heterogeneidad de las lecturas, se determinó para Respuesta proliferativa como el cociente entre la OD<sub>490nm</sub> del control y el experimental. Las barras blancas corresponden a los donadores, mientras que las barras grises corresponden a los pacientes. Se presentan las medias y desviaciones estándar de 6 ensayos independientes. Las diferencias entre grupos entre respuesta de células de donadores y pacientes fueron evaluadas por la prueba Mann Whitney (no paramétrica). Se consideró como significativa una  $p < 0.05$  de 6 ensayos independientes.

Por otro lado, al comparar entre los tratamientos con adipocitocinas, se podría sugerirse que la inducción de la proliferación fue mayor con leptina, en comparación a adiponectina. Sin embargo, este efecto sólo se observó en células de pacientes y sólo comparó el empleo de una concentración de las adipocitocinas.

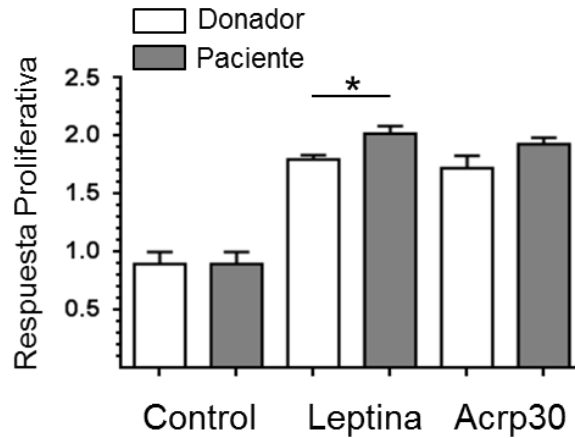
Por otro lado, es bien conocido que la fracción de células CMN incluye varias poblaciones celulares, las cuales pueden variar en proporción entre individuos, así como efecto del proceso patológico. En esas condiciones, resulta entonces necesario verificar estos resultados con una población más homogénea de células. Con ese objetivo, se procedió a purificar los linfocitos T CD4+ tanto de donadores como de pacientes con AR (ver Metodología). Como se puede

observar en la Figura 18, el porcentaje de células CD4+/CD8- obtenidas por purificación magnética y derivadas de sangre periférica de donadores y pacientes fue cercana al 90%, lo cual permite sugerir que los efectos obtenidos se podrán adjudicar fundamentalmente a los linfocitos T CD4.



**Figura 18.- Evaluación del enriquecimiento de linfocitos T CD4+ derivados de sangre periférica de donadores** Posterior al aislamiento por el kit de purificación magnético, la homogeneidad de la fracción obtenida fue verificada por citometría de flujo para los marcadores CD4 y CD8.

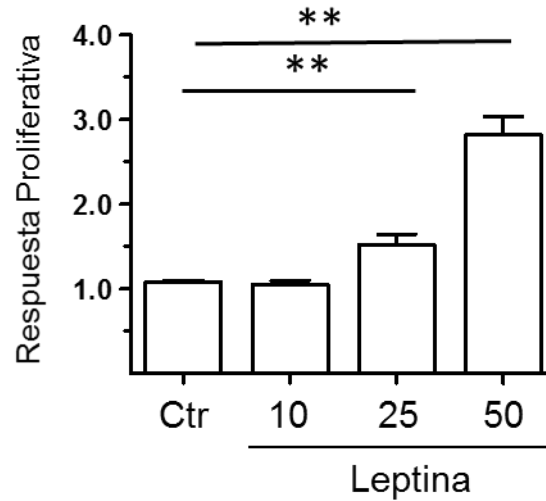
Al repetir los ensayos de incubación con adipocitocinas, pero ahora con una fracción enriquecida de linfocitos T CD4+ observamos en la Figura 19 que tanto la leptina como adiponectina siguieron induciendo un efecto proliferativo en más de 2 veces, con respecto al control e incluso que el tratamiento con PHA, pero cuantitativamente menor que el obtenido con la fracción de CMN (Figura 17). Sin embargo, al comparar entre las células de donadores y pacientes, pudimos confirmar que los linfocitos T CD4+ de los pacientes con AR mostraron una sensibilidad significativamente mayor que los donadores, de manera similar a lo observado con la fracción de células CMN (ver Figura 17). Sin embargo, esta diferencia de sensibilidad entre células de donadores y pacientes, no se confirmó para el tratamiento con adiponectina; en este caso, observamos (Figura 19) que la incubación con adiponectina indujo un incremento de la proliferación, que, aunque cuantitativamente mayor en el caso de linfocitos T CD4 de los pacientes, no se alcanzó una diferencia estadística significativa ( $p= 0.1000$ ).



**Figura 19.- Inducción de la proliferación de linfocitos T CD4+ de donadores y pacientes por efecto de Leptina y Adiponectina.**  $1 \times 10^4$  linfocitos T CD4+ derivados de sangre de donadores y pacientes con AR fueron incubadas en condiciones control, con leptina o con adiponectina. Posterior a 48 hrs de incubación, se evaluó la respuesta proliferativa relativa. Las diferencias entre grupos entre respuesta de células de donadores y pacientes fueron evaluadas por la prueba Mann Whitney (no paramétrica). Se consideró como significativa una  $p < 0.05$  de 6 ensayos independientes.

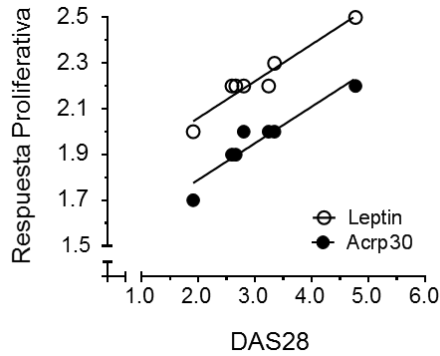
Como una medida de confirmar que el efecto de inducción de leptina sobre los linfocitos T CD4 era real, se realizaron ensayos a diferentes concentraciones de esta adipocitocina. Como se muestra en la Figura 20, la leptina muestra una respuesta proliferativa dependiente de la concentración, ya que no mostró un efecto diferente a las condiciones control a 10 ng/ml, pero a las concentraciones de 25 y 50 ng/ml se observaron incrementos significativos con relación al control y entre ellos.

Como se puede observar la magnitud de la proliferación en Linfocitos CD4+ tiene un comportamiento dosis dependiente con respecto a la concentración de Leptina.



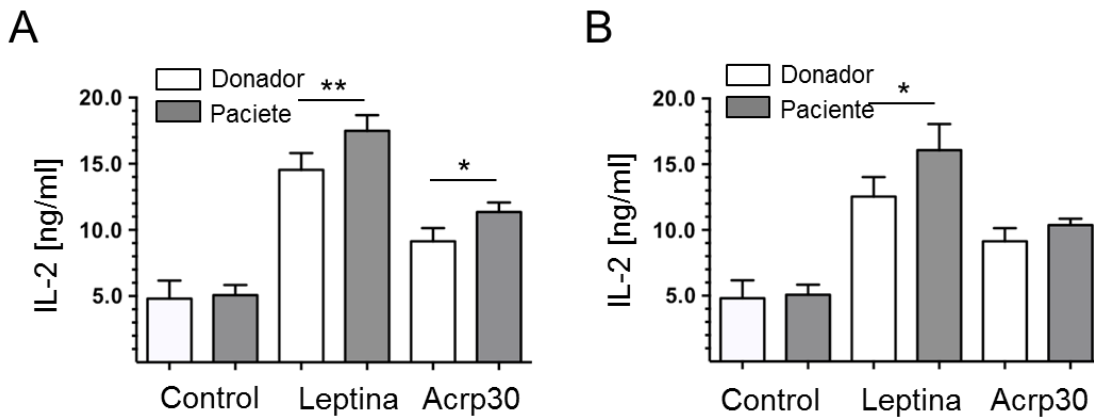
**Figura 20.- Inducción de la proliferación de linfocitos T CD4+ es dependiente de la concentración de leptina.**  $1 \times 10^4$  linfocitos T CD4+ derivados de sangre de donadores y pacientes con AR fueron incubadas en condiciones control o con diferentes concentraciones de leptina (10, 25 y 50 ng/ml). Posterior a 48 hrs de incubación, se evaluó la respuesta proliferativa relativa. Las diferencias entre grupos entre las diferentes estimulaciones fueron evaluadas por la prueba Mann Whitney (no paramétrica). Se consideró como significativa una  $p < 0.05$  de 6 ensayos independientes.

Por otro lado, y con el objetivo de saber sí la susceptibilidad a proliferar como efecto de leptina o adiponectina está relacionado con la actividad clínica de los pacientes de los cuales derivaron las células, se realizó un análisis de correlación estadística entre la respuesta proliferativa relativa para células CMN y el valor de DAS28 de los pacientes reclutados. Como se observa en la Figura 21, en base a un subgrupo de 7 pacientes con AR, observamos que la actividad clínica se correlacionó fuertemente con el efecto proliferativo inducido por Leptina ( $\rho = 0.906$ ,  $p < 0.005$ ) y Acrp30 ( $\rho = 0.954$ ,  $p > 0.005$ ). Esto sugiere que las células de los pacientes con mayor actividad clínica fueron más sensibles al efecto proliferativo inducido tanto por leptina como por adiponectina. De por sí, la única diferencia que observamos entre el efecto de leptina y adiponectina fue el nivel de proliferación, siendo siempre mayor para leptina en nuestras condiciones experimentales.



**Figura 21.- Análisis de correlación entre la actividad clínica (DAS28) y la respuesta proliferativa relativa inducida por leptina o por adiponectina de células CMN de pacientes.** El análisis de correlación se realizó con la prueba de Spearman (no-paramétrica) de un total de 7 muestras celulares de pacientes. Resultados: leptina,  $\rho=0.906$ ,  $p<0.005$  y adiponectina,  $\rho= 0.954$ ,  $p>0.005$ . Los resultados constituyen el promedio de 6 ensayos independientes.

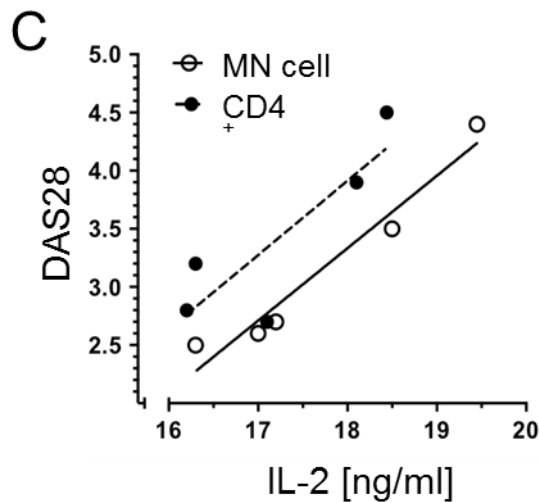
Dado que es bien conocido que IL-2 es un elemento clave para la proliferación de linfocitos T, quisimos evaluar si la respuesta proliferativa inducida por las adipocitocinas estaba relacionada con alteraciones en los niveles de IL-2 en el sobrenadante de cultivo de las células. Como se observa en la Figura 22A, la incubación de células CMN tanto de donadores como de pacientes con leptina o adiponectina indujeron la secreción al medio de cultivo de concentraciones 2 a 3 veces superiores de IL-2, en relación con las condiciones control.



**Figura 22.- Inducción de la secreción de IL-2 por incubación con leptina o adiponectina sobre las células CMN (A) o linfocitos T CD4+ (B) de donadores y de pacientes.**  $1 \times 10^6$  células CMN (A) y  $1 \times 10^6$  linfocitos T CD4+ (B) de donadores y pacientes fueron incubados con 50ng/ml de leptina o 25ng/ml de adiponectina por 48 hrs. Como se describe en Metodología, se determinó los niveles de IL-2 en el sobrenadante de cultivo por ELISA. Las diferencias entre grupos entre respuesta de células de donadores y pacientes fueron evaluadas por la prueba Mann Whitney (no paramétrica). Se consideró como significativa una  $*p<0.05$  o  $**p<0.001$ , de 6 ensayos independientes.

A semejanza de lo observado con la respuesta proliferativa de las células CMN (Figura 17), aquí observamos que la secreción de IL-2 fue significativamente mayor por el tratamiento con cualquiera de las dos adipocitocinas sobre las células CMN de los pacientes, en comparación con las células de los donadores (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ).

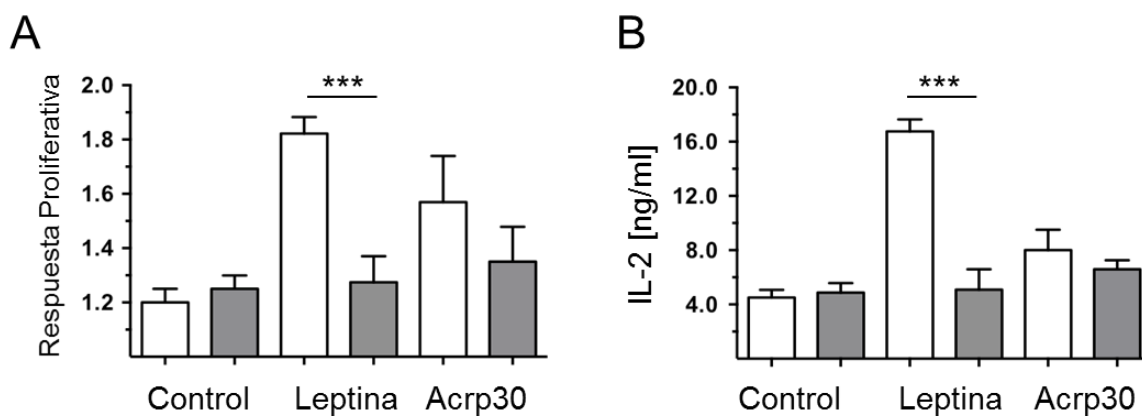
Al repetir estos ensayos de inducción de IL-2, pero empleando preparaciones enriquecidas de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, pudimos confirmar los resultados observados en la respuesta proliferativa. Como se observa en la Figura 22B, la incubación tanto con leptina como con adiponectina indujeron un claro incremento en la secreción de IL-2, en comparación con las condiciones control. A diferencia del efecto observado con células CMN, la incubación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> con adiponectina indujo similar incremento en la secreción de IL-2, tanto en células de donadores como de pacientes. Sin embargo, la incubación de leptina con linfocitos T CD4<sup>+</sup> indujo una mayor secreción de IL-2 en células de pacientes, en comparación con las células de donadores; similar con lo que sucedió al incubar células CMN y los resultados de la proliferación celular. Todo esto parece sugerir que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> presentan una sensibilidad diferente para leptina, pero no para adiponectina.



**Figura 23.- Análisis de correlación entre la actividad clínica (DAS28) y la secreción de IL-2 inducida por leptina de células CMN y linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes.** El análisis de correlación se realizó con la prueba de Spearman (no-paramétrica) de un total de 5 muestras celulares de pacientes. Resultados para CMN:  $\rho = 0.97$ ,  $p < 0.02$ . Resultados para linfocitos T CD4<sup>+</sup>:  $\rho = 0.70$ ,  $p = 0.23$ . Los resultados constituyen el promedio de 3 ensayos independientes.



Por otra parte, se evaluó la posible correlación entre la actividad clínica de los pacientes de los cuales derivaron las células y su sensibilidad a leptina para inducir la secreción de IL-2. Como se observa en la Figura 23, los niveles de IL-2 secretada al medio de cultivo por efecto de la incubación con leptina se correlacionó manera significativa y positiva tanto para células CMN ( $\rho=0.97$ ,  $p<0.02$ ) pero no con linfocitos T CD4+ ( $\rho=0.70$ ,  $p=0.23$ ). Conviene resaltar que un efecto similar fue observado al evaluar la respuesta proliferativa, donde se observó que la respuesta para la leptina fue diferente entre las células de donadores y pacientes, tanto en las preparaciones de CMN como de linfocitos T CD4+.



**Figura 24.- Inducción de la respuesta proliferativa (A) y secreción de IL-2 (B) por incubación con leptina o adiponectina sobre linfocitos T CD4+ de donadores y de pacientes.**  $1 \times 10^6$  linfocitos T CD4+ de donadores y pacientes fueron incubados con 50 ng/ml de leptina por 48 hrs y se determinó la respuesta proliferativa (A) o se determinaron los niveles de IL-2 en el sobrenadante de cultivo (B), en ausencia (barras claras) o en presencia de [0.75 ng] de anticuerpo neutralizante anti-IL-2 (barras grises). Las diferencias entre grupos fueron evaluadas por la prueba Mann Whitney (no paramétrica). Se consideró como significativa una  $*p<0.05$  o  $***p<0.0005$ , de ¿? ensayos independientes.

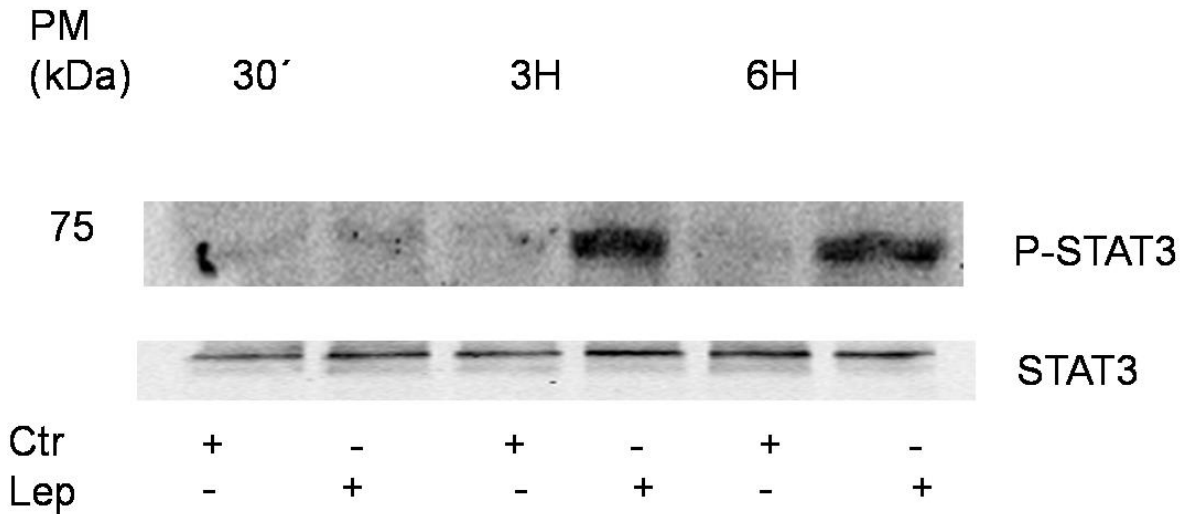
Para corroborar que el efecto proliferativo inducido por leptina era un evento dependiente de IL-2, se repitieron los ensayos de activación utilizando linfocitos T CD4+ purificados en presencia o ausencia de un anticuerpo neutralizante contra IL-2 (ver Metodología). Como se observa en la Figura 24A, la co-incubación con el anticuerpo neutralizante para IL-2 ocasionó la disminución significativa de la proliferación celular inducida por leptina. Aunque el anticuerpo neutralizante parece haber inducido también la disminución de la proliferación celular inducida por adiponectina, este efecto no alcanzó significancia estadística. Por el otro lado, como era de

esperarse, el anticuerpo neutralizante ocasionó la disminución de los niveles de IL-2 en el sobrenadante de cultivo a un nivel cercano a las condiciones control. Nuevamente, el anticuerpo neutralizante parece haber disminuido los niveles de IL-2 inducidos por adiponectina, pero los cambios no fueron estadísticamente significativos. Todo esto sugiere que la inducción de la proliferación de células CMN y linfocitos T CD4+ es fundamentalmente un proceso dependiente de IL-2.

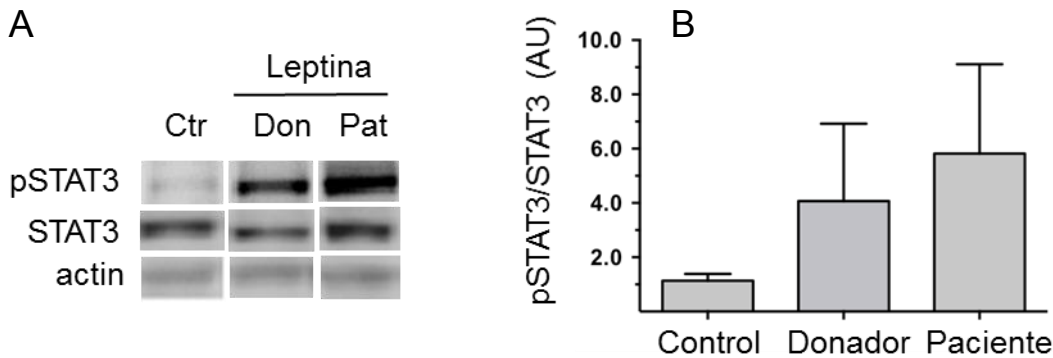
### **6.1.3. Activación de la vía de STAT3**

Considerando que es bien conocido que los receptores para leptina inducen la activación de la cascada de señalización intracelular dependiente de STAT3, a continuación, quisimos verificar si los efectos inducidos por leptina coincidían con la activación de esta cascada de señalización. Con este fin, se realizaron experimentos con células CMN de donadores, las cuales se incubaron con 25 ng/ml de leptina por tiempos cortos de estimulación, se lisaron las células y se evaluó la fosforilación de la Tyr705 de STAT3, que ha sido descrita como parámetro de la activación de este factor transcripcional. En la Figura 25 se observa que la incubación por 3 y 6 hrs con leptina indujo un incremento de la intensidad de la banda correspondiente a la forma fosforilada de STAT3, pero no así a los 30 min de incubación. Esto confirma que la incubación por leptina ocasiona la activación de la vía clásica de estimulación por esta adipocitocinas.

Con el fin de evaluar sí los niveles de activación y de fosforilación de STAT3 inducidos por leptina son diferentes entre las células de donadores y pacientes con AR, células CMN de ambos orígenes fueron incubadas con leptina sólo por 3 horas y se evaluó el nivel de fosforilación en base la intensidad de la banda de p-STAT3. Como se observa en la Figura 25, en la Figura 26 de la izquierda, la intensidad de p-STAT3 fue mayor con las células CMN de pacientes, en comparación con las células de donadores. Por su parte, no se observaron cambios significativos al comparar en las bandas para STAT3 o actina.



**Figura 25.- La incubación de CMN de donadores con leptina ocasionó la fosforilación y activación de la vía de STAT3.** Células CMN derivadas de donadores sanos fueron incubadas con 25 ng/ml de leptina por diferentes tiempos. Al termino del tiempo de incubación, las células fueron lavadas, lisadas y se evaluaron por western blot para presencia de STAT3 y la forma fosforilada en Tyr705 (p-STAT3). Figura representativa de 3 ensayos independientes.



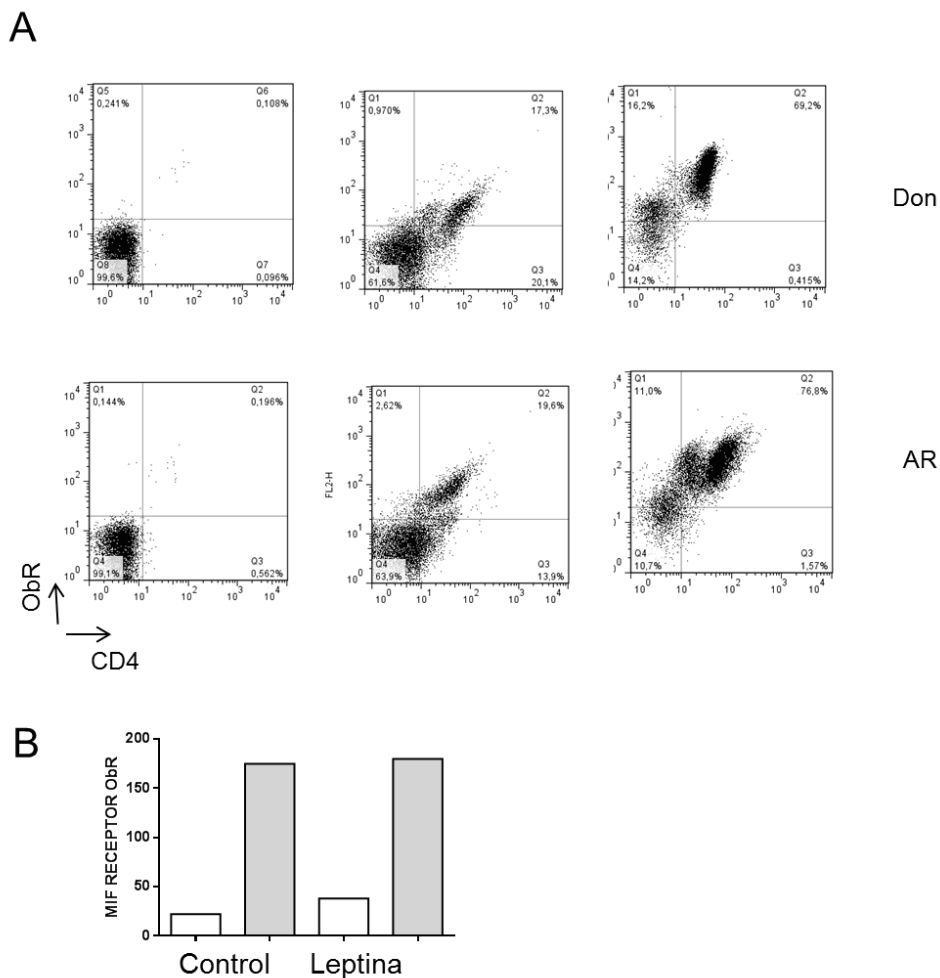
**Figura 26.- Comparación de la fosforilación de STAT3 inducida por leptina de células CMN de donadores y pacientes con AR.** Células CMN derivadas de donadores sanos o de pacientes con AR fueron incubadas con 25 ng/ml de leptina por 3 hrs. Al termino del tiempo de incubación, las células fueron lavadas, lisadas y se evaluó por western blot para presencia de STAT3 y la forma fosforilada en Tyr705 (p-STAT3). Figura de la izquierda compara la presencia de STAT3, p-STAT3 y actina. Figura de la derecha compara los resultados de intensidad relativa de las bandas p-STAT3/STAT3 de 6 experimentos independientes con preparaciones celulares de donadores y pacientes. La comparación entre grupos fue realizado por Mann Whitney, considerando como significativa una  $p < 0.5\%$ .

Sin embargo, cuando este mismo análisis se realizó con muestras celulares de otros 5 donadores y pacientes, el resultado fue no tan claro. Como se observa en la Figura 26, lado derecho, la intensidad relativa de las bandas p-STAT3/STAT3 fue muy heterogénea, resultando

en desviaciones estándar grandes (para donadores y para pacientes). En ese sentido, cuando se empleó la prueba de Mann Whitney para comparar entre grupos, no se alcanzó una p menor a 0.05. En base a estos resultados, se puede decir que se confirmó la incubación con leptina ocasionó la activación de la vía de señalización de STAT3, sin embargo, no se cuenta con evidencia estadística para poder fundamentar que la activación de las células de los pacientes fue superior a la de las células derivadas de donadores.

#### **6.1.4. Efecto sobre la expresión del receptor para leptina.**

Con el fin de explicar diferencias de respuesta ante la incubación con leptina por células de donadores y pacientes con AR, se compararon los niveles del receptor de leptina (ObR) en fracción enriquecida de linfocitos T CD4+ de ambos grupos de individuos posterior a su incubación con leptina. Como se observa en la Figura 27, a nivel basal, las células tanto de donadores como de pacientes presentaron un porcentaje menor al 20% de células CD4+/ObR+ y entre 14 y 17% de células CD4+/ObR-. Posterior a la incubación por 48 hrs (similar a los tratamientos de proliferación) con leptina, las células fueron evaluadas para los marcadores CD4 y ObR. Como se observa en la Figura 24 del lado derecho, leptina ocasionó un incremento de la población CD4+/ObR+ hasta un 69% en donadores y 77% en pacientes. Al comparar en base a la intensidad media de fluorescencia (Figura 27B) observamos un claro incremento en los niveles de ObR, sin embargo, al comparar este incremento entre las células de donadores y pacientes fue muy similar.



**Figura 27.- Efecto de leptina sobre los niveles de ObR en células CD4+ derivadas de sangre periférica de donadores sanos y pacientes con AR.** A. Comparación fenotípica para ObR y CD4 de células incubadas con leptina. Iso: control de isotipo; Bas: niveles basales; Lep: incubados con 50 ng/ml de leptina por 48 hrs. Las células fueron analizadas para los marcadores CD4 y ObR por citometría de flujo, empleando 1x06 células por ensayo. Las gráficas son representativas de 2 ensayos independientes. B. Comparación entre los niveles de intensidad media de fluorescencia para ObR. Barras blancas, condiciones basales; barras grises, incubación con leptina.

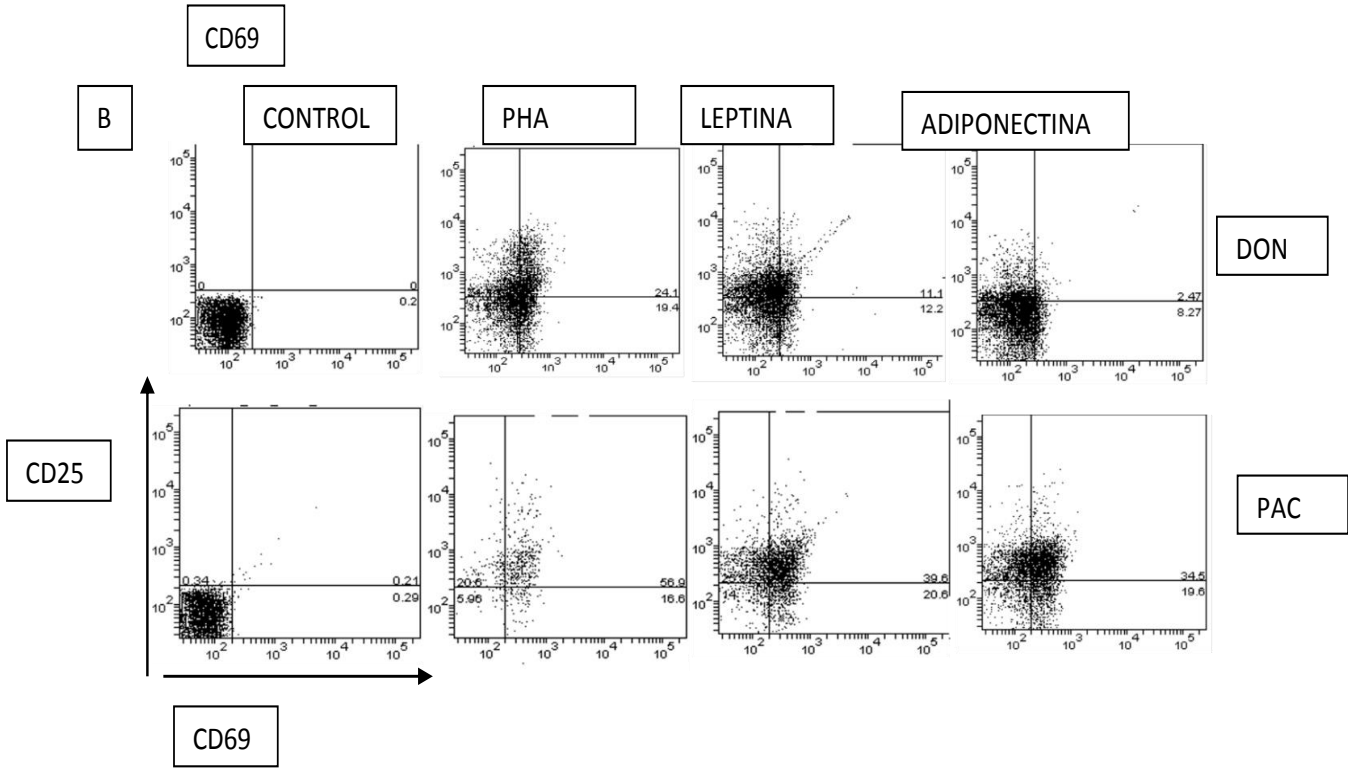
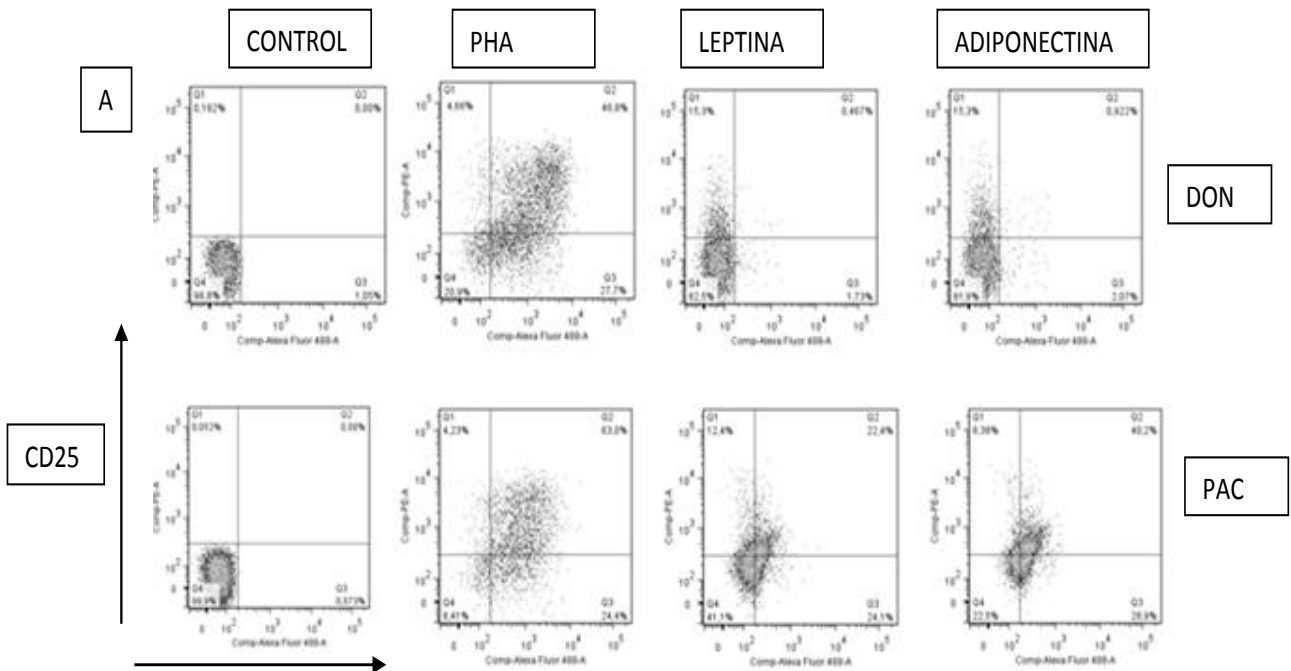
Por otro lado, hay que considerar que incluso las células CD4- mostraron un incremento en los niveles de ObR. También hay que hacer mención que la preparación de células derivadas de los pacientes presentó después del tratamiento con leptina la presencia de dos poblaciones CD4+/ObR+, con similar nivel de ObR, pero diferente nivel de CD4. En su conjunto, estos resultados permiten confirmar que la incubación con leptina induce la expresión de su receptor, posiblemente no sólo en las células CD4+. Sin embargo, este efecto no fue significativamente mayor en las células de los pacientes, en comparación con los donadores, lo cual parece

confirmar que los niveles de activación de la vía de STAT· fueran similares entre las células de donadores y pacientes.

#### **6.1.5. Efecto sobre marcadores de activación CD25 y CD69.**

Los efectos sobre las células MN y linfocitos T CD4+ por la incubación con las adipocitocinas Leptina y Adiponectina también se evaluó en base el incremento de sus marcadores de activación tempranos: CD69 y CD25. En este sentido, se empleó el tratamiento con 10µg/ml de PHA como control positivo. Como se describió en Metodología, todos los tratamientos se evaluaron a las 24 hrs de incubación. Como se puede observar en la Figura 27A, el tratamiento con PHA de las células CMN tanto de donadores como de pacientes, pasaron de ser <1% CD25+/CD69+ a >60% CD25+/CD69+. Por su parte, la incubación con leptina ocasionó un ligero incremento en la expresión de CD25 (15%), pero sin cambio en el marcador CD69, en las CMN de donadores. Sin embargo, el efecto fue significativamente mayor en las CMN de pacientes, donde se observó que leptina indujo incremento (>30%) en ambos marcadores de activación. Esto sugiere, en comparación con experimentos previos, que las células CMN derivadas de los pacientes fueron más sensibles al efecto de la leptina.

Por otro lado, en el extremo derecho de la Figura 28A, se observa el efecto de la incubación por adiponectina con células CMN de donadores y pacientes. A semejanza de lo observado con leptina, las células de donadores mostraron sólo incremento limitado en el marcador CD25, pero la incubación de adiponectina con células de pacientes indujo un incremento mayor en ambos marcadores de activación (>40%).



**Figura 28.- Efecto comparativo de leptina y adiponectina sobre la expresión de marcadores de activación tempranos en células CMN y linfocitos T CD4+ derivados de donadores y pacientes con AR.** A) Células MN de donadores sanos (Don) y de pacientes con AR (AR) fueron incubadas por 24 hrs en condiciones control (Ctr), con PHA (PHA), con 25 ng/ml de leptina y 2.5 ug/ml de adiponectina (ver Metodología). B) Fracción enriquecida de linfocitos T CD4+ (90-94% pureza) fueron incubadas por 24 hrs en las mismas condiciones descritas arriba. Posterior a su incubación, las células fueron evaluadas para la presencia en superficie de los marcadores de activación CD25 y CD69. Dot blots representativos de 3 ensayos independientes.

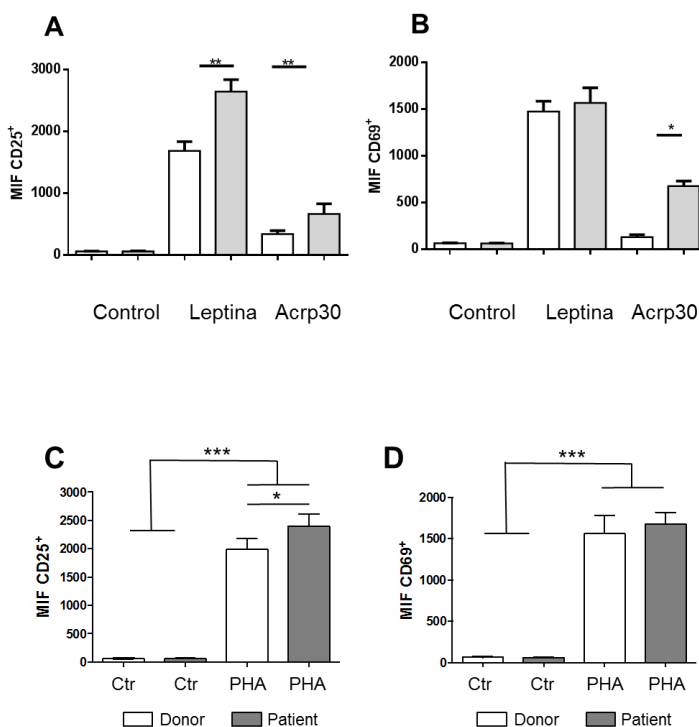
En la Figura 28B se observa los efectos comparativos de la incubación de las dos adipocitocinas con linfocitos T CD4+ de donadores y pacientes con AR. Se puede observar que la incubación con PHA ocasionó un claro incremento en la expresión en superficie de ambos marcadores de activación, en comparación a las condiciones control. Por su parte, la incubación con leptina con células de donadores ocasionó mayor incremento en el marcador CD25, con respecto al marcador CD69. Este resultado recuerda lo observado al emplear la fracción completa de células MN. Por otro lado, al tratar la fracción de linfocitos T CD4+ derivados de pacientes observamos un incremento de ambos marcadores. A continuación, al comparar el efecto obtenido por la incubación con adiponectina, podemos observar que las células de donadores fueron poco sensibles, mostrando un incremento muy bajo (<10%). Sin embargo, cuando se emplearon las células derivadas de los pacientes, el efecto fue mucho mayor (>30%) y sobre ambos marcadores.

Obsérvese que el efecto de inducción fue menor en linfocitos T CD4+ (Figura 28B), aunque la tendencia fue similar a la observada por las células MN (Figura 28A). Asimismo, se observó un mayor efecto de inducción de CD69 para el tratamiento con adiponectina, lo cual apoya su efecto como factor inflamatorio

En la Figura 29 se observa la comparación numérica del incremento de la intensidad media de fluorescencia para los marcadores de activación CD25 y CD69, en tres ensayos independientes empleando células CMN de donadores y pacientes. Como se observa en la Figura 29A y B, el tratamiento con PHA indujo un importante incremento en ambos marcadores y aunque parece haber mostrado similar efecto en células de donadores y pacientes para CD69, la inducción de CD25 fue mayor en las células de pacientes.



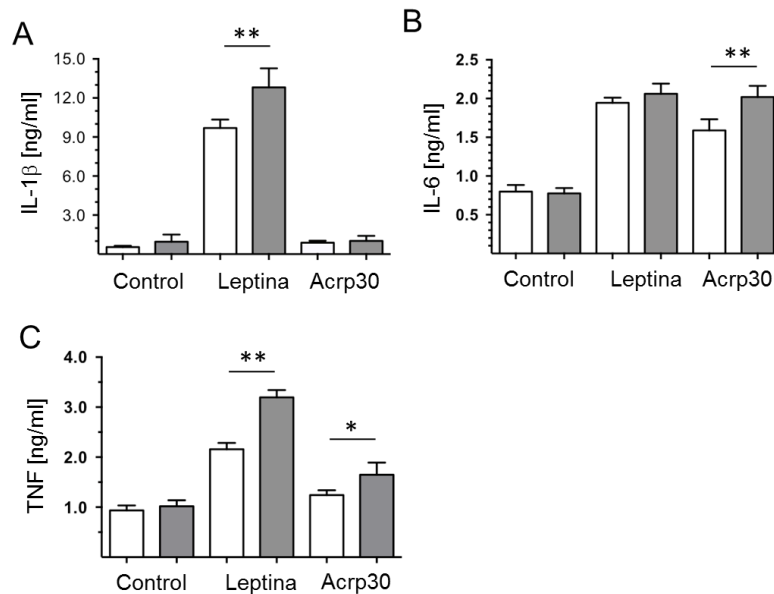
Por su parte, en la Figura 29C se observa el efecto comparativo de los tratamientos con leptina y adiponectina sobre la inducción de CD25. Inicialmente, se puede confirmar que ambas adipocitocinas promueven este marcador de activación, sin embargo, el efecto de la leptina fue comparativamente mayor. El aspecto que nos interesa resaltar fue la diferencia de sensibilidad entre células CMN de donadores y de pacientes, donde estos últimos mostraron una inducción significativamente mayor por efecto de la incubación tanto con leptina como por adiponectina.



**Figura 29.- Comparación cuantitativa en el efecto de inducción de CD25 y CD69 por células CMN de donadores y pacientes por leptina o adiponectina.** Nivel de inducción comparativo de CD25 (A) y CD69 (B) por tratamiento con PHA en células CMN de donadores (barras blancas) o de pacientes con AR (barras negras). C. Nivel de inducción comparativo de CD25 por tratamiento con leptina o adiponectina en células CMN de donadores (barras blancas) o de pacientes con AR (barras negras). D. Nivel de inducción comparativo de CD69 por tratamiento con leptina o adiponectina en células CMN de donadores (barras blancas) o de pacientes con AR (barras negras). Diferencias entre grupos fue evaluada por la prueba Mann Whitney, empleando como significativa una  $p < 0.05\%$ . Resultados corresponden a 3 ensayos independientes.

En la Figura 29D se observa el efecto comparativo de los tratamientos con las adipocitocinas sobre la inducción de CD69 en la superficie de células de donadores

y de pacientes. Similar a lo obtenido con el marcador CD25, CD69 se indujo en mayor nivel por efecto del tratamiento con leptina, en comparación con adiponectina. Sin embargo, en esta ocasión no se observó una diferencia significativa de sensibilidad para leptina entre células de donadores y pacientes. Diferencia que se siguió manteniendo para el tratamiento con adiponectina, donde las células de pacientes fueron estadísticamente más sensibles que las de los donadores.



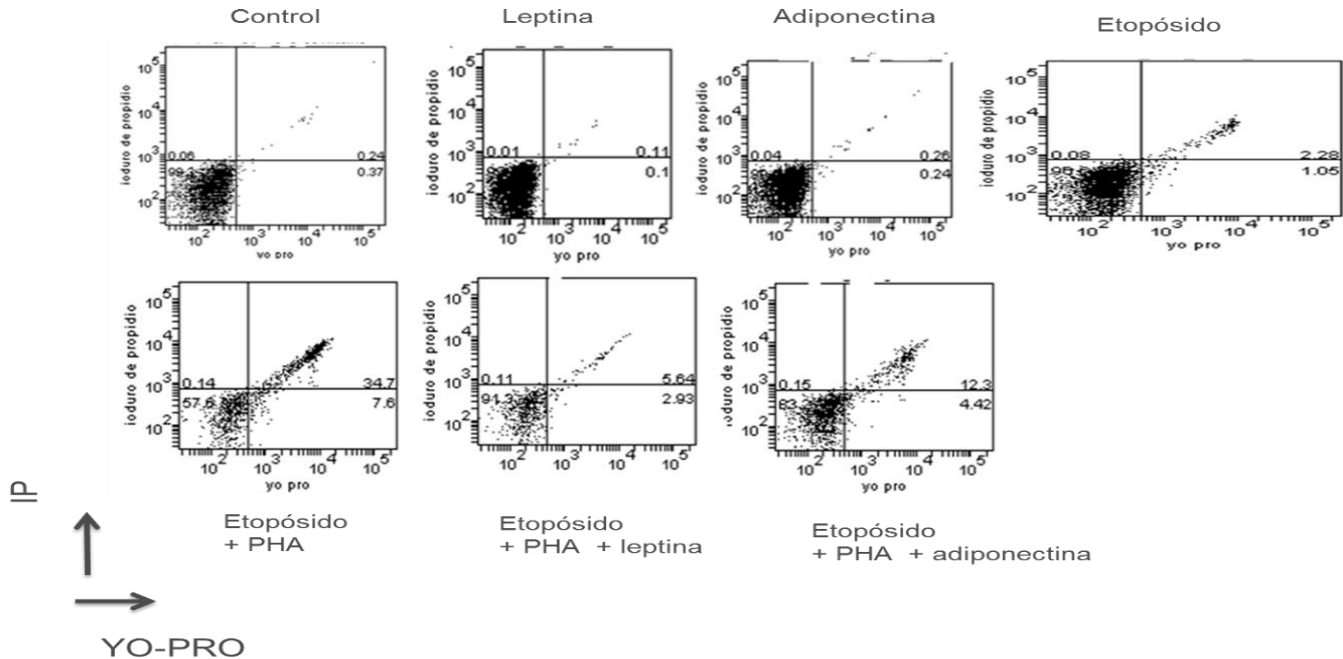
**Figura 30.- Efecto de leptina o adiponectina sobre secreción de IL-1, IL-6 o TNF-  $\alpha$  en células de donadores control y pacientes con AR.** A,) Niveles comparativos en sobrenadante de IL-1 $\beta$  de las células T CD4 + de donadores (barras blancas) y células del paciente (barras grises) estimuladas por leptina y Acrp30 (n = 5). Los niveles de sobrenadante de IL-1 $\beta$  aumentaron a través de la estimulación con leptina en células de pacientes en comparación con células de donantes (p <0.01). B) niveles comparativos en sobrenadante de IL-6 derivado de células T CD4 + de donadores (barras blancas) y células de paciente (barras grises) estimuladas por leptina y Acrp30 (n = 5). Los niveles de sobrenadante de IL-6 aumentaron considerablemente con la estimulación con Acrp30 en las células de los pacientes en comparación con las células de donadores (p <0,01). C) niveles comparativos de sobrenadante de TNF $\alpha$  de donadores sanos (barras blancas) y de células T CD4 + (barras grises) del paciente estimuladas con leptina o Acrp30 (n = 5). Los niveles de sobrenadante de TNF aumentaron con la leptina y la estimulación con Acrp30 en las células de los pacientes, en comparación con las células de donadores (p <0,01 y <0,03, respectivamente).

Adicionalmente, también se evaluó la secreción de citocinas a sobrenadante de cultivo al incubar las células con leptina o adiponectina. Como se observa tras 24 horas de incubación con Leptina se detecta un aumento en los niveles de IL-1 $\beta$  en

los sobrenadantes de células de pacientes con respecto a los donadores. Por lo contrario, los niveles de IL-6 fueron mayores ante el estímulo de Adiponectina y se observa un aumento de secreción ante el aumento de Leptina, pero no existen diferencias significativas entre células de donadores sanos y las de pacientes. Finalmente, ante el estímulo de ambas adipocitocinas hubo un aumento en secreción de TNF $\alpha$  ante el estímulo de las 2 adipocitocinas y es importante denotar existen diferencias significativas entre donadores y pacientes.

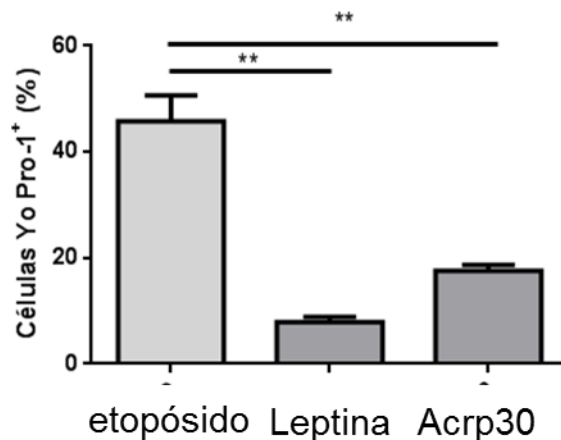
#### **6.1.6. Efecto de leptina sobre el rescate de muerte celular**

Por otra parte, en base a antecedentes en la literatura, también se evaluó el efecto de las adipocitocinas sobre el proceso de apoptosis en las células CMN de donadores. Como control positivo se empleó el etopósido cuyo efecto citotóxico está ampliamente estudiado. Como se puede observar en la Figura 31, la incubación solo con etopósido (derecha del primer renglón de dot blots) ocasionó un incremento limitado en células YoPro+/ioduro de propidio+, sugiriendo que se encontraban en apoptosis. Por su parte, la incubación con leptina o adiponectina no indujeron apoptosis en las células CMN de donadores. Con el fin de incrementar el efecto apoptótico del etopósido, las células co-incubaron con [10 $\mu$ g/ml] de PHA lo cual ocasionó un incremento entre 30-40% de células YoPro+/ioduro de propidio+. En estas condiciones, las células fueron co-incubadas con 25 ng/ml de leptina o 2.5 ng/ml de adiponectina por 24 hrs. En comparación al tratamiento sólo con PHA/etopósido, tanto leptina como adiponectina ocasionaron una disminución grande en el efecto apoptótico.



**Figura 31.-Efecto anti-apoptótico inducido por leptina o adiponectina sobre células CMN de donadores.** Células CMN de donadores fueron incubadas en condiciones control, con etopósido, con leptina, con adiponectina o con mezclas: PHA/etopósido, PHA/etopósido+leptina o PHA/etopósido+adiponectina durante 24 hrs. Al final del tratamiento se evaluó el porcentaje de células YoPro+. Figuras representativas de 3 ensayos independientes.

En la Figura 32 se presenta la comparación cuantitativa del efecto protector de la apoptosis inducida por leptina o adiponectina. Mientras el tratamiento con PHA/etopósido ocasionó que el 45% de las células adquirieran el fenotipo YoPRo+, las células CMN de donadores co-incubadas con adiponectina mostraron un fenotipo apoptótico en menos del 20%, mientras que aquellas co-incubadas con leptina no alcanzaron el 10%, niveles que ambos casos fue significativamente menor al efecto del etopósido. Todo esto parece sugerir, como lo planteado en la literatura para leptina, que ambas adipocitocinas favorecen la sobrevivencia o inhiben la muerte celular de CMN de donadores.



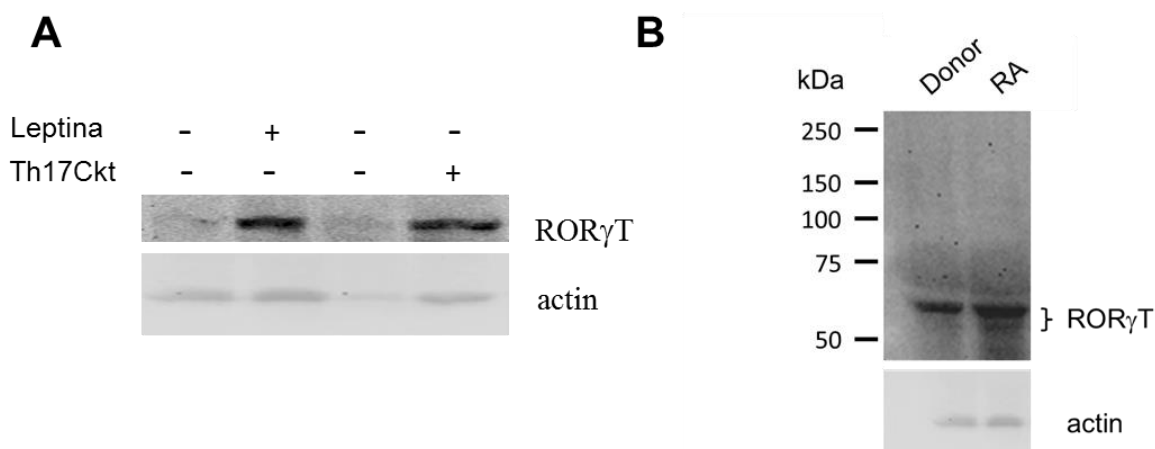
**Figura 32.- Análisis cuantitativo del efecto anti-apoptótico inducido por leptina o adiponectina sobre células CMN de donadores.** Células CMN de donadores fueron incubadas con PHA/etopósido, PHA/etopósido+leptina o PHA/etopósido+adiponectina durante 24 hrs. Al final del tratamiento se evaluó el porcentaje de células YoPro+. Diferencias entre grupos fue evaluada por la prueba Mann Whitney, empleando como significativa una  $p < 0.05\%$ . Resultados corresponden a 3 ensayos independientes.

### 6.1.7. Inducción de la diferenciación hacia fenotipo Th17

En estudios previos de nuestro laboratorio se había observado que los pacientes con AR además de mostrar niveles más elevados de leptina e IL-17, con respecto a los donadores; la existencia de una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de leptina y los niveles de IL-17, por lo cual consideramos que pudieran estar biológicamente relacionadas. Por eso, quisimos evaluar si la incubación con leptina era capaz de favorecer la diferenciación o respuesta tipo Th17. Considerando que el efecto de leptina pudiera ser heterogéneo para las diferentes poblaciones celulares incluidas en las CMN, decidimos realizar estos experimentos con preparaciones altamente enriquecidas en linfocitos CD4+ de donadores y de pacientes con AR. Por otro lado, como control positivo de la inducción de la respuesta tipo Th17, se empleó un cocktail de citocinas y anticuerpos (ver Metodología) descrito en la literatura para favorecer tanto la expresión del factor de transcripción ROR $\gamma$ T y la secreción de IL-17 en la preparación de linfocitos T CD4+.

Como se describe en Metodología, estos ensayos fueron realizados con incubación por 7 días, con suplementación de leptina cada tercer día. Al final de ese tiempo, las células y los sobrenadantes de cultivo fueron colectados y analizados para la presencia de ROR $\gamma$ T y los niveles de IL-17.

En la Figura 33 también se observa que la incubación con leptina indujo tanto en los linfocitos T CD4+ de donadores como de pacientes la presencia del factor ROR $\gamma$ T, sugiriendo la inducción del fenotipo Th17. (IL-1 $\beta$ , 50 ng/ml, IL-6 ,10 ng/ml IL-23, 5 ng/ml TGF- $\beta$ ,). Otro aspecto a resaltar es el hecho de que la intensidad de la banda para ROR $\gamma$ T parece que fue mayor para los linfocitos T derivados de pacientes con AR, que podría significar una mayor sensibilidad, también, para diferenciarse hacia el fenotipo Th17.



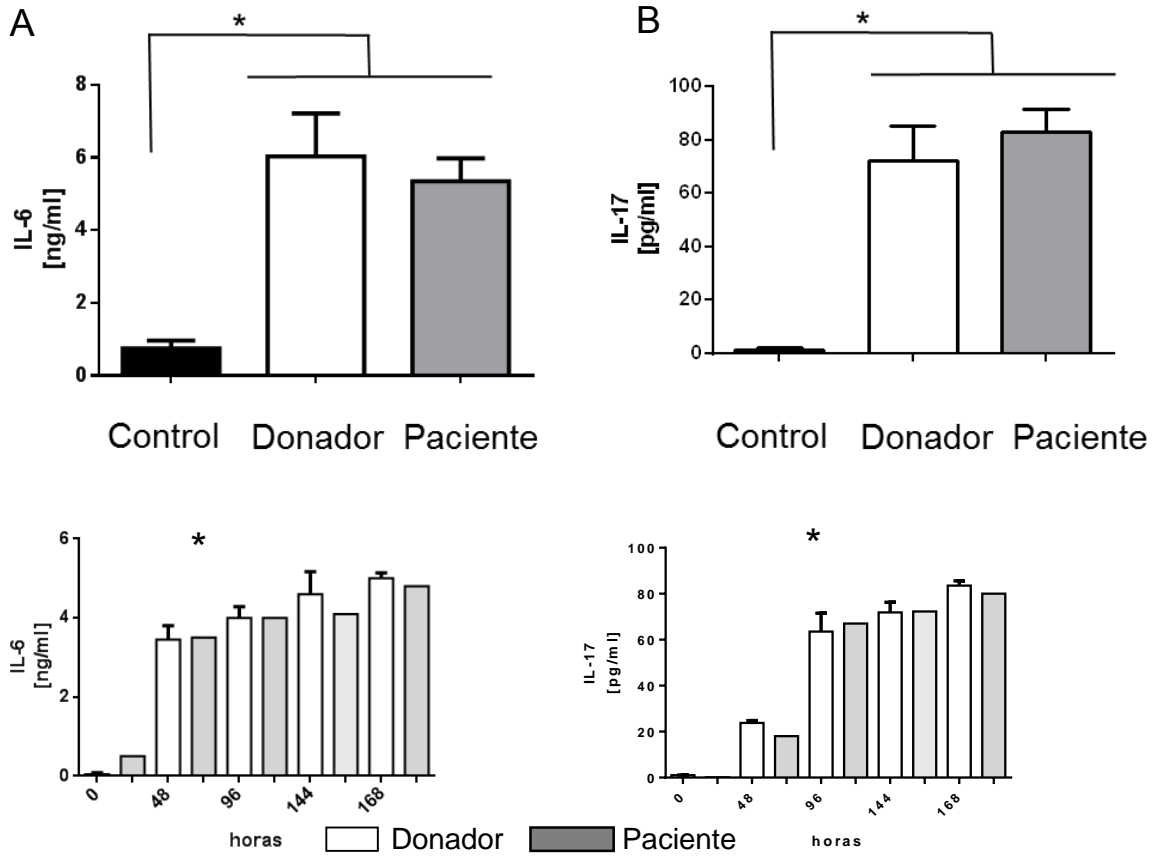
**Figura 33.- Efecto del tratamiento por 7 días con leptina sobre expresión del factor de transcripción ROR $\gamma$ T en linfocitos T CD4+ de donadores y pacientes con AR.** A)  $1 \times 10^6$  linfocitos T CD4+ derivados de donadores o pacientes fueron incubados por 7 días con un cocktail de inducción de respuesta TH17 (20 ng/ml IL-1 $\beta$ , 50 ng/ml IL-6 ,10 ng/ml IL-23, 5 ng/ml TGF- $\beta$ ,). leptina y al final, las células fueron cosechadas, lavadas y lisadas. La inducción del factor transcripcional ROR $\gamma$ T fue evaluada por western blot, empleando actina como estándar de carga de proteína. Ensayo representativo de 2 ensayos independientes.

Por otro lado, también se evaluaron los sobrenadantes de cultivo a lo largo de los 7 días de incubación y se determinaron los niveles de IL-6 e IL-17. Como se observa en la Figura 34A y B se observan los niveles de IL-6 e IL-17 en el sobrenadante de cultivo, respectivamente, al término del tratamiento de 7 días. Se

puede observar que tanto los niveles de IL-6 como de IL-17 fueron significativamente mayores en células incubadas con leptina, en comparación con células control (células incubadas el mismo tiempo pero sin estímulo de leptina). Por otro lado, al comparar entre linfocitos T CD4+ de donadores y de pacientes no pudimos observar una diferencia significativa en la secreción de ambas citocinas, por el tratamiento con leptina.

En la Figuras 34C y D se observan los niveles de IL-6 e IL-17, respectivamente, a lo largo de los diferentes días de incubación con leptina, iniciando con el día 2 (48 hrs). En términos generales, se observa que el tratamiento con leptina ocasionó el incremento de la secreción de ambas citocinas y los niveles se fueron incrementando conforme pasaron los días de incubación. Hay que resaltar, sin embargo, que los niveles de IL-17 mostraron un incremento muy importante a partir del día 4 de incubación, significativamente mayor a los niveles observados 24 hrs previas. Esto no sucedió con los niveles de IL-6, que gradualmente se incrementaron desde el día 2 de incubación. Esto podría ser interpretado como una indicación de que los linfocitos T CD4+ con menos de 4 días de incubación con leptina son menos responsivos para secretar IL-17, pero a partir de este tiempo cambia la respuesta de las células y son capaces de secretar 3 a 4 veces más citocina al mismo tratamiento de leptina.

Con los resultados mostrados podemos proponer que Leptina es capaz de diferenciar hacia un estado inflamatorio TH17, si bien no sabemos los mecanismos que utiliza es importante mencionar que con base a literatura la respuesta TH17 necesita la activación de STAT3 molécula que es activada por Leptina además observamos la secreción de IL-17 e IL-6.



**Figura 34.- Respuesta TH17 producida en linfocitos T CD4 + bajo el estímulo de Leptina por 7 días.** Efecto de leptina o adiponectina sobre secreción de IL-6 o IL-17- $\alpha$  en células de donadores control y pacientes con RA. A,) Niveles comparativos en sobrenadante de IL-6 de las células T CD4 + de paciente estimuladas por leptina(n=2) en células de donador (barras blancas) y células del paciente (barras grises) y Acrp30 (n = 2). Los niveles de sobrenadante de IL-6 aumentaron a través de la estimulación con leptina en células de pacientes en comparación con células de donantes ( $p < 0.01$ ). B) Niveles comparativos en sobrenadante de IL-17 de las células T CD4 + de paciente estimuladas por leptina(n=2) en células de donador (barras blancas) y células del paciente (barras grises) y Acrp30 (n = 2). Los niveles de sobrenadante de IL-17 aumentaron a través de la estimulación con leptina en células de pacientes en comparación con células de donantes ( $p < 0.01$ ). C) niveles comparativos de sobrenadante de IL-17 e IL-6 de donadores sanos (barras blancas) y de células T CD4 + (barras grises) del paciente estimuladas con leptina o Acrp30 (n = 2), a lo largo de 7 días.



## 6.2. ESTUDIO CLÍNICO

### 6.2.1. Datos generales de los donadores y pacientes

**Tabla 5.-** Datos demográficos del estudio clínico

	<b>Pacientes (n = 121)</b>	<b>Donadores (n = 90)</b>	<b>p</b>
<b>Género (F/M)</b>	116/5	85/5	ns
<b>Edad (DE<sup>a</sup>)</b>	46 (12)	32.6 (8.74)*	P<0.05
<b>IMC<sup>b</sup>(DE)</b>	26.7 (4.26)	28.7 (4.3)	ns
<b>Tiempo de evolución (DE)</b>	8.2 (8.5)	NA	-
<b>DAS28 (DE)</b>	4.60 (1.5)	NA	-
<b>FR<sup>c</sup> [U/ml]</b>	628.5 (870)	NA	-
<b>aPCC<sup>d</sup> [U/ml]</b>	111.7 (82)	NA	-
<b>Leptina [ng/ml]</b>	0.31 (0.1)	0.23 (0.05)	<0.05
<b>Adiponectina [ng/ml]</b>	159.1 (83)	90.07 (28)	<0.01
<b>Resistina [ng/ml]</b>	1.45 (0.73)	1.29 (0.48)	ns
<b>TNF-<math>\alpha</math> [ng/ml]</b>	16.0 (0.6)	8.5 (0.7)	<0.05
<b>IL-17 [pg/ml]</b>	116 (43)	35.4 (20.3)	<0.01
<b>IL-6 [ng/ml]</b>	5.12 (0.10)	5.40 (0.11)	ns

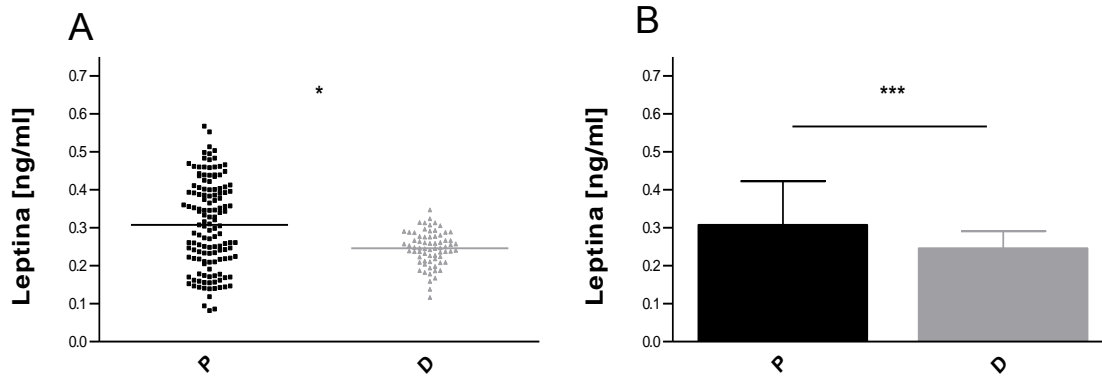
<sup>a</sup>Desviación estándar; <sup>b</sup>,IMC, Índice de masa corporal; <sup>c</sup>,FR, factor reumatoide; <sup>d</sup>aPCC, antiPéptido citrunilado cíclico.

Este estudio se realizó en colaboración de 131 pacientes y 90 donadores, el IMC, de los pacientes como se puede ver en la tabla nos indica que la población de estudio es obesa. Los pacientes en promedio tienen una enfermedad activa (DAS 4.6), una edad promedio de 46 años, una proporción de género de 23:1 es decir para cada 23 mujeres hay un hombre.

Los Pacientes que formaron parte de este estudio, fueron aquellos que voluntariamente aceptaron participar y a los cuales se les determinaron parámetros de peso, talla y glucosa.

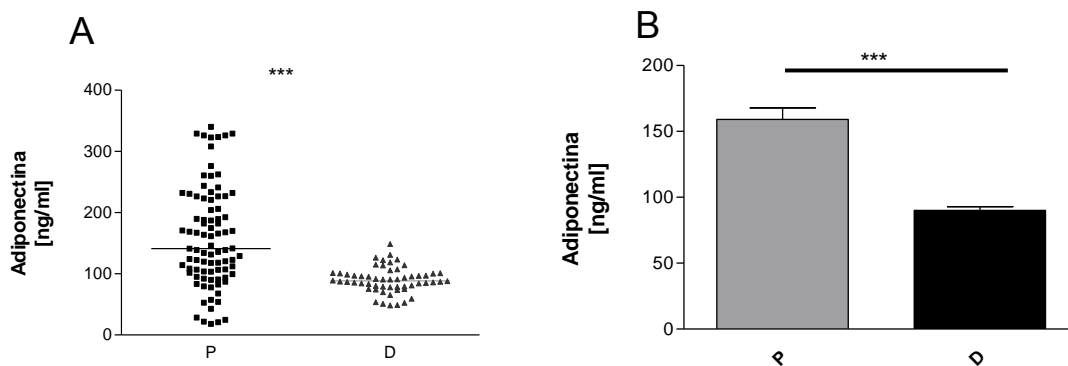
Los Pacientes con AR activa que recibían en el momento de captura de la muestra un tratamiento, este solo consistía en prednisona, cloroquina, metotrexato y/o AINES. Por su parte, los donadores fueron reclutados en el Banco de Sangre con el fin de favorecer que fuera población sana. Adicionalmente, los donadores fueron pareados con las poblaciones de pacientes en base al sexo (M/H), la edad y el IMC.

En las condiciones de análisis descritas arriba, se procedió a evaluar los niveles de leptina de las dos poblaciones en estudio: donadores sanos (n=90) y pacientes con AR (n=121). En la Figura 35A y B podemos observar que los niveles de leptina en pacientes son mayores en pacientes ( $0.3079 \pm 0.009$  ng/ml) con respecto a los niveles en donadores ( $0.2364 \pm 0.005$  ng/ml). Al evaluar esta diferencia por la prueba de t de Mann Whitney t, obtuvimos una  $p < 0.0001$ , lo cual indica que la diferencia entre pacientes y donadores es significativa. Conviene resaltar que observamos un nivel de variación considerable entre los individuos, particularmente en los pacientes con AR, donde podemos observar pacientes con niveles semejantes a los donadores, al tiempo que otros pacientes presentan niveles 3 veces mayores al promedio de los donadores.



**Figura 35. Niveles de leptina en plasma encontrado entre pacientes con AR y donadores.** A) Gráfica de puntos donde se muestran las evaluaciones de leptina. B) Gráfica de barras que muestra el promedio de las concentraciones de leptina, en sangre periférica de pacientes (P) y donadores (D) con la enfermedad.

En el presente estudio, los niveles de la adiponectina fueron más elevados en pacientes con AR con respecto a los donadores sanos, pacientes  $159.1 \pm 8.8$  ng/ml y donadores  $90.07 \pm 2.8$  ng/ml (ver Figura 36). Al evaluar por la prueba de Mann-Whitney obtuvimos una p de 0.001, lo cual indica que la diferencia entre los niveles de pacientes con AR y donadores sanos fue estadísticamente significativa. En la Figura 36 se observa que las valoraciones en los pacientes mostraron un alto grado de variación (entre 50 y 300 ng/ml), a diferencia de lo que observamos en los donadores, donde los niveles fueron similares.



**Figura 36.- Niveles de Adiponectina en plasma de pacientes con AR y donadores.** A) Gráfica de puntos donde se muestran los niveles diferentes encontrados entre donadores y pacientes. B) Gráfica de barras que muestra el promedio de las concentraciones de adiponectina, en sangre periférica de pacientes (P) y donadores (D) con la enfermedad. Mann whitney  $p > 0.001$

### **6.2.2. Comparación entre niveles de adipocitocinas y citocinas pro-inflamatorias**

Para definir que un paciente presenta AR activa en el presente estudio se consideró un umbral de 2.6 en la escala de DAS28 (menor a 2.6 fue considerado como no-activo y mayor de 2.6 representa a un proceso activo), nivel que coincide con varios otros trabajos en el área de la reumatología (Welsing 2001).

Debido a que la población de pacientes que estudiamos presentaba amplia heterogeneidad, decidimos re-analizar la relación de los parámetros clínicos e inflamatorios de acuerdo a la actividad, separando los pacientes en base a su evaluación clínica: A) pacientes actividad baja (<3.5), B) pacientes con actividad moderada (3.5 a 5.1,) y, C) pacientes con alta actividad (>5.1,).

Como, se mencionó anteriormente, 121 pacientes con AR fueron incluidos en el estudio. Vale la pena reconocer que hubo diferencias en el número de pacientes para cada subgrupo de actividad, con solo 22 pacientes en el grupo de baja actividad, mientras que 56 pacientes tuvieron actividad moderada, y 43 pacientes en actividad alta. (Tabla 5). Sin embargo, los tres subgrupos fueron similares en género, edad, IMC, tiempo desde el inicio de la enfermedad y títulos de anticuerpos de RF o anti-CCP, este último para pacientes con actividad moderada y alta. Aunque la mayoría de los pacientes tenían sobrepeso, no se observaron diferencias de este parámetro entre los subgrupos de actividad.

Por otra parte, como se observa en la tabla 5, si se encontró una diferencia significativa de leptina, resistina, IL-6 y niveles de IL-17 al comparar entre los subgrupos de acuerdo a la actividad clínica, usando el análisis de ANOVA. En el caso particular de leptina, cuando se comparó entre los subgrupos de actividad clínica, todos mostraron diferencias estadísticamente significativas lo que sugiere una relación positiva con el aumento en la puntuación DAS28. De manera similar, se observó una diferencia de medias estadísticamente significativa para los niveles de resistina al comparar el grupo de baja versus el de actividad alta. ( $p < 0,0007$ ); sin

embargo, esto no fue el caso al comparar los subgrupos de actividad moderada versus alta ( $p = 0.080$ ) o al comparar la actividad baja versus moderada ( $p = 0.107$ ).

En contraste, la adiponectina no mostró diferencias entre los subgrupos de actividad clínica, sin embargo, el grupo de pacientes con actividad baja ( $DAS28 < 3.5$ ) presentó un nivel mayor de adiponectina, con respecto a los e3más subgrupos. Esto sugiere que los niveles de adiponectina resultan de eventos posiblemente inflamatorios característicos de los pacientes con menor actividad

La Artritis Reumatoide como ya se describió previamente, es una enfermedad de inflamación sistémica dado esto, es importante realizar un análisis estadístico en el cual se involucre las adipocitocinas con patrones de inflamación como lo son las citocinas pro-inflamatorias. En nuestro estudio, se llevó a cabo el análisis de 4 citocinas que participan en la inflamación como lo son IL-1,  $TNF\alpha$  IL-6 e, IL-17. En el análisis las citocinas se observa heterogeneidad entre los subgrupos, En el caso de IL -6 el subgrupo de actividad bajo, mostró menores niveles que el moderado ( $p = 0.015$ ) o subgrupos de actividad alta ( $p = 0.004$ ). Del mismo modo, para IL-17, el subgrupo de actividad baja también mostró niveles más bajos de IL-17 en comparación con el subgrupo de actividad moderada ( $p = 0.016$ ) o alta ( $p = 0.0003$ ).

**Tabla 6.** Tabla comparativa entre pacientes estratificados de acuerdo a la actividad clínica.

	<b>Actividad baja</b>	<b>Actividad Moderada</b>	<b>Actividad Alta</b>	<b>P</b>
<b>Número</b>	22	56	43	-
<b>Género (M/F) (%F)</b>	1/21(95.5)	2/54(96.4)	2/41(95.2)	Ns
<b>Edad (DE<sup>a</sup>)</b>	43,5(12.5)	46.3(10.7)	45.8(12.2)	Ns
<b>IMC<sup>b</sup>(DE)</b>	29.5(10.3)	27.7(4.9)	26.9(4.7)	Ns
<b>Tiempo de evolución (DE)</b>	7.35(9.3)	7.62(8.4)	6.72(7.9)	Ns
<b>FR<sup>c</sup> (positivos) (%)</b>	76.5	83.8	88	Ns
<b>aPCC<sup>d</sup> (positivos) (%)</b>	36.8	64.9	60	Ns
<b>DAS28 (DE)</b>	2.83(0.53)	4.33(0.49)	6.22(0.77)	<0.001
<b>Leptina [ng/ml]</b>	0.228(0.09)	0.301 (0.10)	0.368(0.009)	<0.001
<b>Adiponectina [ng/ml]</b>	178.7 (94.4)	153.0(74.3)	151.4(88.4)	Ns
<b>Resistina [ng/ml]</b>	271.9(7,2)	352.8(162)	441.1(175)	0.01
<b>TNF<math>\alpha</math> [ng/ml](DE)</b>	1.471(094)	1.570 (1.15)	1.635(1.222)	Ns
<b>IL-1<math>\beta</math> [pg/ml]</b>	852.5(143)	973.3(714)	494.6(163)	Ns
<b>IL-6 [pg/ml]</b>	507.28(145)	601.0(127)	631.8(132)	0.01
<b>IL-17 [pg/ml]</b>	65.5 (40.1)	101.6(47.8)	121.1 (39.4)	<0.01

### 6.2.3. Análisis de correlación

Con el objetivo de confirmar estadísticamente la presencia de una correlación, entre los parámetros clínicos, adipocitocinas y citocinas inflamatorias, se analizaron los niveles de pacientes, de manera global de cada uno de los parámetros antes mencionados, a través de la prueba correlación de Spearman. En estas condiciones, se observó que niveles de leptina se correlacionaron positivamente con DAS28 ( $\rho$

= 0.513,  $p < 0,0001$ ), pero no con la edad, el tiempo desde el inicio de la enfermedad o el IMC. También hubo una correlación importante entre Leptina e IL-1 ( $\rho = 0.585$ ,  $p < 0.0001$ ), lo que sugiere una relación entre esta adipocitocina y la respuesta inflamatoria.

Por otra parte, se observaron correlaciones significativas entre resistina ( $\rho = 0.274$ ,  $p < 0.05$ ) y TNF $\alpha$  ( $\rho = -0.277$ ,  $p < 0.005$ ). Asimismo, los niveles de resistina mostraron una relación positiva con DAS28. ( $\rho = 0.403$ ,  $p < 0.0001$ ) pero no con los otros parámetros clínicos. Es importante de denotar que, resistina solo mostró una asociación positiva significativa con leptina ( $\rho = 0.277$ ,  $p < 0.001$ ) y niveles de IL-6 ( $\rho = 0.256$ ,  $p < 0,05$ ).

Por su parte, el mismo análisis confirmó la ausencia de una asociación de adiponectina con la actividad de la enfermedad ( $\rho = -0.151$ ,  $p > 0.05$ , Tabla 2), sin embargo, se observa una correlación negativa con TNF $\alpha$  ( $\rho = -0.418$ ) e IL-17 ( $-0.283$ ,  $p < 0.05$ ), y una correlación positiva con IL-1 ( $\rho = 0.596$ ).

Tanto IL-6 como IL-17 mostraron una correlación positiva significativa con DAS28 ( $\rho = 0.313$ ,  $p < 0.005$ ;  $\rho = 0.373$ ,  $p < 0.0001$  para IL-6 e IL-17, respectivamente). De igual forma, existe una correlación significativa entre DAS28 e IL-1 ( $\rho = 0.213$ ,  $p < 0.05$ ). Es importante de observar que los niveles de TNF $\alpha$  fueron no se asociaron a actividad clínica (tabla 6).

**Tabla 7.** Tabla de correlación entre parámetros inflamatorios

	<b>Años de evolución</b>	<b>IMC</b>	<b>DAS28</b>	<b>Leptina</b>	<b>Acrp30</b>	<b>Resistina</b>	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>IL-6</b>	<b>IL-17</b>
<b>Age</b>	0.096	-0.065	0.078	0.008	-0.814	-0.046	0.117	-0.079	0.558	0.053
<b>Años de evolución</b>		-0.014	-0.065	-0.077	-0.139	-0.193	-0.119	-0.153	0.070	-0.069
<b>IMC</b>			0.052	-0.060	-0.077	-0.061	-0.016	-0.094	0.067	0.235*
<b>DAS28</b>				<b>0.512***</b>	-0.151	<b>0.401</b>	-0.014	0.213*	0.313** *	0.373** *
<b>Leptina</b>					-0.141	0.274	- <b>0.277*</b> *	<b>0.585**</b> *	0.221	0.159
<b>ACRP30</b>						0.058	- <b>0.418*</b> **	<b>0.596**</b> *	0.189	-0.283*
<b>Resistina</b>							-0.061	0.106	0.256*	0.004
<b>TNF<math>\alpha</math></b>								- <b>0.581**</b> *	0.135	0.483** *
<b>IL-1<math>\beta</math></b>									0.459** *	- 0.427** *
<b>IL-6</b>										0.104



## **7. DISCUSIÓN**

### **7.1. Estudios in vitro**

#### **7.1.1 Leptina**

La Artritis Reumatoide es una enfermedad muy compleja, por lo cual dista mucho de ser comprendida totalmente. Por ello consideramos que estudiar los procesos que conllevan a su desarrollo, podría contribuir a comprender cada vez mejor los mecanismos celulares y fisiopatológicos que llevan a su evolución clínica y, sobretodo permitirían proponer nuevos blancos terapéuticos o biomarcadores pronósticos que podrían redundar en mejor control de la enfermedad, con menores daños radiográficos y, sobre todo, alcanzar una remisión de largo plazo.

En el presente estudio, nos centramos en la evaluación de eventos celulares de las adipocitocinas y su posible relación con los parámetros clínicos de pacientes con AR. Debido a que la capacidad de estas proteínas para regular la respuesta inmunológica aún no ésta del todo elucidada, consideramos importante caracterizar el efecto de cada una de estas moléculas sobre la respuesta celular en células mononucleares derivadas de sangre periférica, específicamente, en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, que son células de gran importancia para la evolución de la patología. De igual manera, el estudio de la contribución de estas adipocitocinas en el perfil inflamatorio sistémico y su efecto sobre los efectos celulares podría sugerir nuevos blancos potencialmente terapéuticos o de pronóstico en pacientes con AR.

Para el presente estudio se requirió de la colaboración del Servicio de Reumatología del Hospital General de Cuernavaca (bajo la tutela del Dr Xibille-Friedmann) y del Centro Estatal de la Transfusión Sanguínea, dado que todas las muestras plasmáticas y celulares fueron de donadores y pacientes de estos centros. Asimismo, hay que comentar que el presente protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital General de Cuernavaca.

En nuestros resultados se confirmó lo que en estudios previos se había observado (), que la leptina induce un efecto proliferativo en los linfocitos T CD4+ de sangre periférica (Martín-Romero *et al*, Lord, 2002). Sin embargo, la observación más novedosa del presente estudio fue que este efecto fue significativamente mayor en las células de pacientes con AR, lo cual parece sugerir que la posible contribución de leptina puede amplificarse en los pacientes con AR. Como evidencia de esto, aquí observamos una correlación significativa y positiva entre el incremento de la actividad clínica y la sensibilidad a la proliferación. Esto último, resulta particularmente importante, ya que se ha encontrado a nivel plasmático que los niveles de leptina, se encuentran más elevados en pacientes respecto a donadores sanos y que correlacionan también con la actividad clínica (Batún Garrido 2018, BustosRivera-Bahena 2016).

De acuerdo con el efecto proliferativo de las células mononucleares y linfocitos T CD4+ inducido por leptina y adiponectina, también confirmamos que ambas adipocitocinas inducen la secreción de la citocina IL-2. A ese respecto, se reconoce que esta citocina parece jugar un papel importante en el establecimiento de la respuesta inflamatoria crónica en la AR (Simmon, 1988, Kozanidou 2005, Hughes-Austin, 2012). En ese contexto, no es sorprendente que la respuesta proliferativa inducida por la leptina en nuestros ensayos *in vitro* haya sido dependiente de la acción de IL-2, como se confirmó mediante el uso de un anticuerpo neutralizante específico. A este respecto, estudios anteriores también respaldan nuestros resultados sobre que existe una asociación entre los niveles de IL-2 y la actividad clínica de los pacientes (Innaba, 1997, Kozanidou, 2005, Hughes-Austin, 2012).

Para poder explicar el mayor nivel de sensibilidad de las células sanguíneas derivadas de pacientes con AR, proponemos que el cambio obedece al incremento en los niveles en superficie celular del receptor de leptina, en respuesta al incremento de los niveles plasmáticos de la adipocitocina. A ese respecto, pudimos confirmar que la incubación *in vitro*, por 48 hrs, con leptina recombinante induce un incremento notable en los niveles del receptor ObRm, tanto en células CD4+ como células CD4-

así mismo, tanto en células derivadas de donadores como de pacientes. A ese respecto hay que mencionar que se observó la presencia de dos poblaciones de células ObR<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, con diferencias sobretodo en los niveles de CD4<sup>+</sup>, hallazgo del cual no conocemos antecedentes y aún no hemos estudiado con detalle. De estos experimentos, podemos proponer que los niveles elevados de esta adipocitocina circulante podrían favorecer la sobreexpresión de su receptores en las células mononucleares y, particularmente, en los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, de los pacientes con AR. Esta modulación del receptor también se observó mediante estimulación *in vitro* por PHA o infección por VIH (Sanchez-Margalet, 2002). Sin embargo, este efecto no fue significativamente mayor en las células de los pacientes, en comparación con los donadores, como lo fue en este estudio.

Otro elemento que refuerza nuestra propuesta de que las células mononucleares de los pacientes con AR, posiblemente por su exposición con niveles mayores de adipocitocinas, así como de citocinas pro-inflamatorias, ocasiona un incremento de su estado de activación, es el incremento que observamos sobre los niveles de los marcadores de activación CD25 y CD69. Múltiples estudios han evidenciado que CD25 y CD69 constituyen moléculas de superficie que se incrementan por efectos de activación, al tiempo que aumentan su sensibilidad a estímulos del microambiente. El hecho de observar un incremento de los marcadores CD25 y CD69 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> incubados con leptina sugiere que directa o indirectamente (IL-2), el incremento en los niveles circulantes de leptina podrían pre-activar las células sanguíneas, incluso sin estar aún infiltradas en el espacio sinovial. Sin embargo, hay que hacer notar que el efecto diferencial entre células de donadores y pacientes no fue similar entre CD25 y CD69, mientras que la leptina indujo un incremento importante de CD25 en las células de pacientes, este efecto diferencial no lo pudimos observar para el marcador CD69.

Una explicación complementaria para explicar los efectos diferenciales de la leptina sobre las células de los pacientes supone que la estimulación intracelular podría ser mayor en los pacientes, en comparación con los donadores sanos. Sin

embargo, al evaluar los niveles de fosforilación de STAT3 no pudimos observar una diferencia estadística significativa. También hay que decir que son tantos los factores que pueden alterar la fosforilación STAT3, que es difícil garantizar su control. Con el objetivo de disminuir la variabilidad experimental, se compararon los niveles de fosforilación tras 3 hrs de incubación con leptina recombinante y, sin embargo, como se puede observar en la gráfica de la Figura 23, se obtuvieron desviaciones estándar grandes, lo que seguramente influyó para no poder ver diferencias significativas entre las células de donadores y pacientes. Por su parte, también resulta importante resaltar que el tiempo de estimulación es muy diferente de los tiempos donde se observaron diferencias de proliferación, secreción y estimulación de los marcadores CD25 y CD69 (48 hrs. Adicionalmente, también otra limitación fue el hecho de que se comparó un número pequeño de muestras celulares, por lo que es posible que la tendencia pueda cambiar al incrementar el número de observaciones.

Nuestros resultados además parecen confirmar que la leptina parece influir de manera significativa en la patología, dado que es capaz de inducir la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1b y TNF-a, efecto que había sido observado previamente (Zarkesh-Esfahanji, 2001 Lord, 2002, Sanchez-Margalet 2003). Además, un estudio previo mostró que un anticuerpo monoclonal específico para inhibir la asociación entre la leptina y su receptor también era capaz de bloquear la producción de TNF $\alpha$  en monocitos humanos (Fazeli, 2006). De Rosa *et al.* han demostrado que la leptina también fue capaz, de modular el estado anérgico y la proliferación de clonas de linfocitos T reguladores (Treg), a través de un mecanismo dependiente de IL-2 (De Rosa, 2007). Por otro lado, también la leptina fue capaz de modular las respuestas de las células efectoras T, a través de mTOR (Procaccini, 2012). En base a estos antecedentes y sumándose a nuestros resultados *in vitro* ofrecen una imagen compleja del efecto que puede ejercer las alteraciones de los niveles de leptina en un proceso patológico-inflamatorio.

Como se ha visto en otros estudios, nuestros resultados concuerdan con lo encontrado, sobre los linfocitos T estimulados con leptina como es el caso del efecto

de la proliferación (Lord, 1998), la secreción proinflamatoria de citocinas (Martín Romero 2000), la inducción de marcadores de activación como CD25 y CD69 (Martín Romero, 2000), la regulación positiva del receptor de leptina (Zarkesh-Esfahanji ,2001) y activación de la vía de señalización STAT3 (Papathanassoglou, 2006). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que las células de los pacientes son más sensibles al efecto de leptina respecto a las de donadores sanos, lo que posiblemente explica la presencia de niveles más altos de la hormona en la sangre de los pacientes con AR.

Los resultados generales de este documento respaldan estudios previos que proponen un papel modulador de la leptina en el establecimiento de la inflamación crónica durante el desarrollo de la AR. Sin embargo, su participación podría ser modificada por varios otros factores de pacientes como la genética, la edad, el IMC, la duración de la enfermedad (Tian 2014, Dessein, 2014) e incluso la obesidad (Ajeganova, 2012).

### **7.1.2 Adiponectina**

Por su parte, la adiponectina parece jugar un papel controvertido en la modulación del sistema inmunitario y la inflamación: en algunos escenarios se observa un efecto anti-inflamatorio, pero en otros tiene potencial de contribución inflamatoria y destrucción de tejidos. Hoang Van Tong *et al.* en el 2016 establecen una relación de IL-1b, TNF $\alpha$  y adiponectina, proponiendo a adiponectina como un marcador pronóstico y una intervención terapéutica para el sobrepeso relacionado en diabetes mellitus de tipo 2 (Hoang Van Tong, 2016). Así también, en AR, Neumann *et al.* sugieren en sus estudios, un papel activo de adiponectina en procesos inflamatorios, en destrucción de la matriz y procesos fibróticos que contribuyen a la destrucción articular (Neumann, 2011). Hughes-Austin, en el 2018 encontraron una asociación positiva al medir adiponectina y citocinas proinflamatorias en pacientes con niveles altos de FR y  $\alpha$  CCP en AR. (Hughes-Austin, 2018). Por eso resultaba particularmente atractivo el comparar su efecto *in vitro* con poblaciones celulares

relativamente aisladas. En esas circunstancias, observamos que su incubación con PBMC o linfocitos T CD4+ indujo un aumento significativo en la proliferación, en comparación con las células no estimuladas. De igual manera, también observamos que el tratamiento llevó a la secreción de IL-2 y al rescate de la muerte inducido por etopósido. Todo eso refuerza nuestra propuesta de que adiponectina induce un efecto pro-inflamatorio en células sanguíneas. Sin embargo, a diferencia de los efectos diferenciales observados para la leptina observados, los efectos inducidos por adiponectina fueron diferentes al emplear células CMN, pero se perdió cuando se emplearon linfocitos T CD4+. Esto podría implicar que otro tipo de células, diferentes a los linfocitos T CD4+, podrían contribuir a inducir la diferencia entre donantes sanos o células de pacientes, como los monocitos y NK (Keustermans, 2017). Si bien algunos estudios han mostrado la presencia de receptores Acrp30 (ADIPOR1 y R2) en los linfocitos T (Gilardino, 2007), su porcentaje parece ser muy pequeño (Wilk, 2014), lo que podría explicar nuestros resultados. Lamentablemente, a diferencia del receptor de leptina, donde demostramos que la incubación con el ligando induce el incremento en los niveles en superficie del receptor, no pudimos realizar el mismo tipo de ensayo en las células CMN o linfocitos T CD4+. De por sí, este tipo de ensayo se complica, como describió en la introducción debido al hecho de que hay al menos 2 receptores con afinidades aparentemente diferentes a la forma molecular de la adiponectina. De esta manera, se ha sugerido que las formas moleculares de la propia adiponectina podrían explicar su afinidad a uno u otro receptor y, por lo tanto, inducir efectos fisiológicos diferentes.

### **7.1.3 Fenotipo Th17**

En un estudio de seguimiento a 2 años con pacientes con AR (Xibille, et al. 2009), observamos una correlación positiva entre los niveles de leptina e IL-17, lo cual podría sugerir que el incremento en los niveles de esta adipocitocina podría influir en el fenotipo Th17 de los linfocitos T, la cual se ha asociado a procesos inflamatorios

crónicos, como es el caso de la AR. Al inicio de este proyecto solo teníamos conocimiento de sólo un estudio, con células MN de sangre periférica de pacientes de la enfermedad Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), en donde observaban que ante la estimulación con leptina se promovía la secreción de IL-17 (Liu 2008). Por lo que parecía interesante evaluar *in vitro* la relación entre la leptina y la secreción de IL-17. En el transcurso de este tiempo, algunos otros grupos de trabajo sacaron a la luz resultados que refuerzan nuestra propuesta de la relación funcional entre leptina e IL-17. En el 2013, Yun *et al*, reportaron que en ratones *ob/ob* también se encontraba disminuida la cantidad de células Th17, y que se restauraba la población Th17 en respuesta a la administración de leptina. Adicionalmente, confirmaron una correlación positiva entre los niveles de IL-17 con los niveles de plasma, en Lupus Eritematoso Sistémico (LES), y finalmente observaron en PBMC y en células de su modelo murino para SLE que leptina promovía la respuesta TH17 a través de ROR $\gamma$ T. (Yu, 2013). Por otra parte, Reis y cols. mostraron que la señalización a través del receptor ObR podría regular la respuesta Th17 (Reis, 2015). Asimismo, empleando un modelo murino de AR inducido colágeno, Deng y cols. observaron que linfocitos T CD4+ naive, incubados con leptina, promovían una respuesta tipo Th17.

En este marco, nuestros experimentos sugieren que el tratamiento prolongado con leptina favorece la expresión sostenida del factor de transcripción ROR $\gamma$ T en los linfocitos T CD4+ en cultivo. Asimismo, esta adipocitocina fue suficiente para promover la secreción de IL-17 al medio de cultivo. Hay que resaltar que la inducción de IL-17 fue significativamente mayor desde el día 3 de tratamiento, aunque los niveles se fueron incrementando hasta el día 7, donde se concluyó el estudio. Hay que resaltar, sin embargo, que este efecto inducido por leptina, afectó por igual a los linfocitos T de donadores o de pacientes con AR. Hay que hacer mención, sin embargo, que este tratamiento ofreció resultados similares al inducido por un cocktail de citocinas y anticuerpos neutralizantes, que se propone como tratamiento para inducir el fenotipo Th17.

La AR se caracteriza por ser un proceso inflamatorio crónico, en donde los sistemas de tolerancia inmunológica, tales como la muerte celular, parecen perder su control. En este sentido, también podría sugerirse que la leptina podría favorecer la activación y supervivencia de los linfocitos T infiltrados en la articulación inflamada. Acorde con esto, se ha sugerido que la leptina promueve la supervivencia de los linfocitos T modulando la expresión de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-xL, en la apoptosis inducida por estrés (Fujita 2002). De esta manera, se podría favorecer el estado inflamatorio crónico en los pacientes con AR. Como se observa en los ensayos de apoptosis, la incubación con leptina rescata de la muerte celular a los linfocitos T. En el caso Adiponectina, poco se conoce sobre su papel anti apoptótico, Tian *et al.*, en sus estudios revelan que adiponectina protege a las células stem mesenquimales, contra la apoptosis relacionada en condiciones de hipoxia / ausencia de suero, fenómeno mediado por AdipoR1 vinculada a las vías de señalización de AMPK, (Tian, 2016), así también la inhibición de la apoptosis por adiponectina podría estar vinculado a mecanismos utilizados por leptina vía mitocondrial.



## 7.2. Estudio Clínico

Los pacientes fueron reclutados en la clínica de Reumatología del Hospital General de Cuernavaca en Morelos, México, entre 2007 y 2009 y todos los pacientes siguieron una estrategia de tratamiento similar: metotrexato (7.5 a 15 mg / semana) en combinación con cloroquina 150 mg / día y prednisona  $\leq 10$  mg / día. La actividad de la enfermedad se midió utilizando DAS28 en función del número de articulaciones periféricas inflamadas y dolorosas, la evaluación general de los pacientes mediante la escala analógica visual (VAS) y la tasa de sedimentación eritrocítica (ESR). Los pacientes se sometieron a una evaluación clínica realizada por un único reumatólogo; lo que hasta cierto punto nos permitió homologar los resultados clínicos.

Aunque se sugiere que los niveles de las adipocitocinas dependen del contenido de tejido graso blanco, en este estudio el IMC parece no haber ejercido un papel significativo en los niveles de citocinas/adipocitocinas cuando se realizaron los análisis de correlación. El sexo, la edad, el tiempo desde el inicio o la VSG también se controlaron y los cambios en los niveles de citocinas o adipocitocinas se mostraron independientes a estas variables.

Para el análisis comparativo, los pacientes fueron estratificados de acuerdo al índice de actividad DAS28, siguiendo los criterios del EULAR: baja actividad de la enfermedad ( $DAS28 \leq 3.5$ ), actividad moderada ( $DAS28 > 3.5$  a  $\leq 5.1$ ) y alta actividad de la enfermedad ( $DAS28 > 5.1$ ). Inicialmente, al hacer una comparación entre los grupos sólo se pudo observar diferencias significativas en los niveles de leptina, resistina, IL-6 e IL-17, los cuales fueron incrementándose con la actividad de la enfermedad.

Previamente otros grupos habían evaluado la posible relación clínica entre estos factores adipogénicos y la actividad clínica en pacientes con AR, sin embargo, en su conjunto los resultados fueron muy heterogéneos y variados. Primero, los estudios presentaron diseños muy diferentes entre ellos; segundo, la variación en las características antropométricas y genéticas de las diferentes poblaciones estudiadas

ocasionó la obtención de resultados muy dispares; tercero, las técnicas de evaluación fueron diferentes. Todo esto, en lugar de ayudar, dificulta en el establecimiento de una propuesta científica. En ese sentido se puede observar que algunos grupos reportan una asociación significativa entre los niveles de leptina y la actividad (Otero 2006, Targonska-Stepniak, 2008, Targonska-Stepniak 2010), pero otros estudios no observaron esta relación (Popa 2005, Bokarewa 2003). A pesar de todo esto, y considerando que la prevalencia de sobrepeso-obesidad es muy alta en la población mexicana, consideramos que sería importante determinar el nivel basal de estas adipocitocinas en la población sana de nuestro país, al tiempo de comparar con los pacientes con AR.

En este estudio, pudimos nuevamente confirmar que los niveles de leptina se incrementan a la par de la actividad clínica de la enfermedad ( $\rho$  de Spearman=0.512,  $p<0.0001$ ). En base a estos resultados, se podría proponer que la relación entre la leptina y la actividad clínica de la AR es directa. En ese sentido, los experimentos in vitro con leptina permiten fortalecer su papel como inductor de la respuesta inflamatoria. Resulta significativo que el incremento de leptina parece ocurrir de manera independiente a la proporción de grasa corporal (IMC), por lo que uno podría sugerir dos explicaciones: 1) durante la inflamación crónica, los adipocitos son estimulados a secretar más leptina; 2) las otras fuentes de leptina son el blanco de la estimulación inflamatorio. Sin embargo, hay que reconocer que el IMC no es la mejor medida de la grasa corporal.

Al realizar los análisis de correlación simple, pudimos confirmar que los niveles de leptina se asociaron de manera positiva con el incremento en los niveles de resistina y los niveles de IL-1b, fortaleciendo su papel como inductor de la inflamación. A diferencia de las publicaciones de otros autores, no encontramos una correlación entre la leptina y la IL-6 o de IL-17, posiblemente debido a las diferencias en el origen de las muestras (líquido sinovial versus sangre periférica) y el diseño (transversal vs. longitudinal) (Xibille-Friedmann, 2010, Olama, 2012).

Por otra parte, nuestro estudio permite sugerir que los niveles de resistina se asocian positivamente con la actividad de la enfermedad ( $\rho=0.274$ ,  $p<0.05$ ), mientras que la resistina mostró una correlación limitada con otras citocinas inflamatorias. La mayoría de los estudios, solo realizan una comparación entre donadores y paciente y proponen una participación en el proceso inflamatorio, pero no correlacionan con la actividad. (Migita, 2006,). Aunque aún falte mucho por elucidar, Su y colaboradores proponen que el papel de Resistina consiste en el desencadenamiento de la angiogénesis en respuesta al “homing” e infiltración de células progenitoras endoteliales hacia el sinovio en el proceso inflamatorio de la artritis reumatoide, sugiriéndolo como un blanco terapéutico.

Por el contrario, los niveles de la adiponectina parecen no estar asociados con la actividad de la enfermedad clínica; sin embargo, mostró una asociación diferencial con los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ : una correlación positiva con IL-1b y una negativa con TNF- $\alpha$ . Estudios previos han confirmado la relación antagonista entre el TNF- $\alpha$  y la adiponectina y han observado un efecto sinérgico de la adiponectina y la IL-1b para promover la secreción de citocinas proinflamatorias. (Zappala, 2009). Sin embargo, aún existe controversia sobre su papel exacto en la inflamación de la AR (como observamos en la sección anterior) el papel de adiponectina en AR está fuertemente vinculado hacia la inflamación. Así también, adiponectina tiene un importante papel metabólico en sensibilidad a la insulina, que podría influir en las características de cada paciente dependiendo de otros factores como la adiposidad.

Según lo observado por otros autores, (Chen, 2011), los niveles circulantes de IL-6 e IL-17 de pacientes con actividad moderada/alta (DAS28 > 3.5) fueron significativamente más altos que los de pacientes en remisión o con baja actividad de la enfermedad. Sin embargo, el análisis de correlación ofreció un modelo complejo de relación entre las citocinas para una enfermedad inflamatoria como la AR. Mientras TNF-a se asoció positivamente con IL-17, presentó una correlación negativa con IL-1b y no se encontró asociación con IL-6. En apoyo de nuestros resultados,

estudios previos han observado una relación antagonista entre TNF e IL-1b. (Sakito, 1995). Así también se encontró una asociación positiva entre IL-1 $\beta$  e IL-6. En la Figura 36 se muestra un escenario hipotético de la relación entre las adipocitocinas leptina, adiponectina y resistina, sobre los efectos celulares en CMN y linfocitos T y posible influencia sobre la actividad clínica de los pacientes con AR. En base a esta hipótesis, resulta atractiva la posibilidad de favorecer la remisión del paciente mediante la regulación farmacológica de las adipocitocinas, además del hecho de que un cambio en el estilo de vida del paciente, podría significar disminuir el contenido de tejido graso blanco y, por tanto, la disminución de los niveles de leptina y resistina. Todos estos cambios podrían ayudar en el control del proceso inflamatorio y de los síntomas en los pacientes con AR.

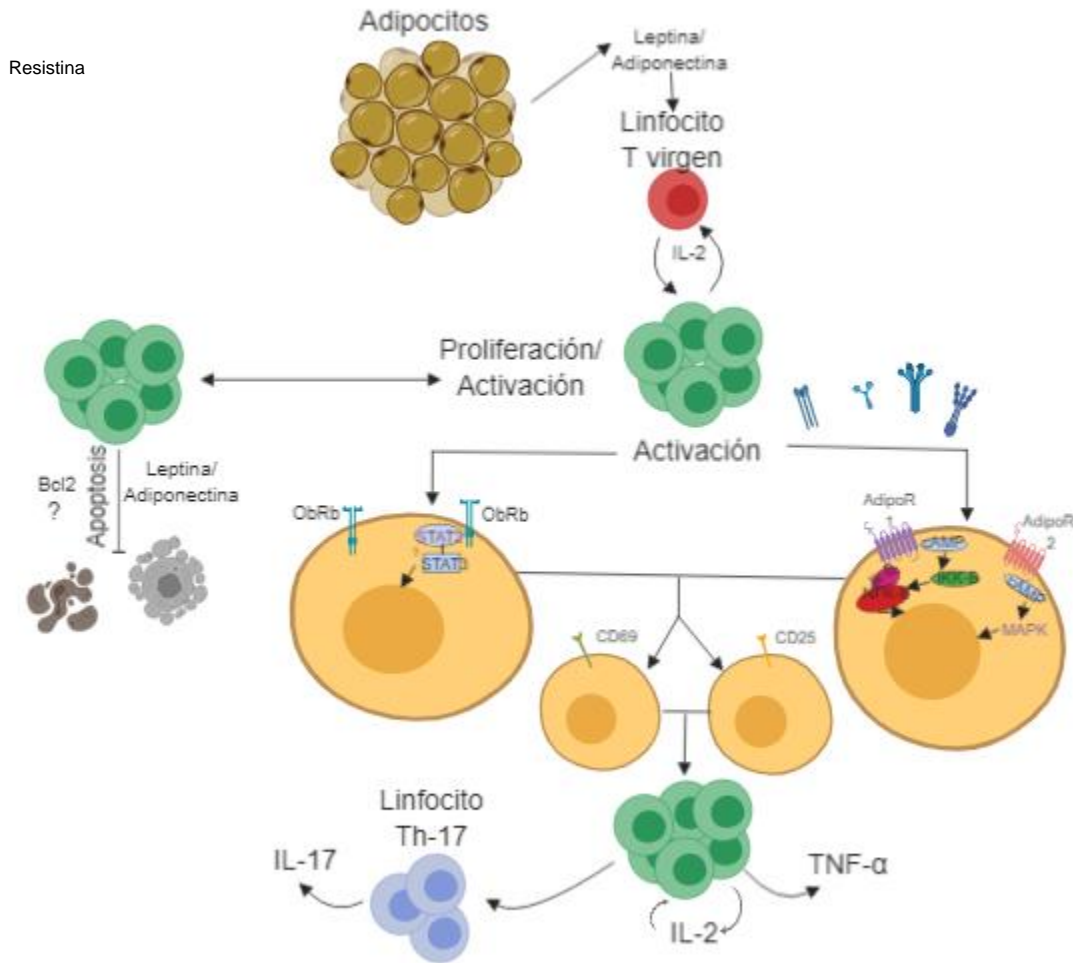


Figura 37.- Posible participación de las adipocitocinas en el proceso inflamatorio inducido durante el desarrollo de la Artritis Reumatoide

### 7.3 Limitaciones del estudio

Continuando en este tenor, no existen muchas evidencias que evalúen los efectos in vitro de las adipocitocinas en pacientes con AR PBMC y células T, y mucho menos en AR y ciertamente deben ser confirmados por otros grupos, ya que el papel inflamatorio de estas sigue siendo discutido. El presente estudio, sin embargo, tiene varias limitaciones, que incluyen un tamaño de muestra pequeño, la heterogeneidad del tratamiento con DMARD y las limitaciones en el tratamiento.

De las poblaciones de estudio, algunos donadores fueron excluidos del estudio ya que mostraron índices de IMC y edad, diferentes del grupo de pacientes, por lo que preferimos parear las poblaciones de estudio con base a estos parámetros. Sin embargo y dado que se obtuvieron resultados que parecen involucrar a las adipocitocinas en un papel clave dentro de la patogenia de AR, analizar, sería recomendable aumentar el tamaño de muestra con el fin de que los resultados sean más concluyentes.

Es importante denotar que debido al hecho de que los pacientes no tuvieron acceso a la terapia biológica y que la toxicidad debida al metotrexato se observó con frecuencia con dosis de más de 15 mg / semana, en muchos casos no se logró una remisión parcial o completa, un factor que también desempeña un papel en los resultados. Sin embargo, dado que todos los pacientes fueron seguidos y tratados por un solo médico, los criterios clínicos empleados para su evaluación fueron homogéneos.

## 8. CONCLUSIONES

1. La incubación *in vitro* de leptina indujo un nivel significativamente mayor de proliferación de células mononucleares de sangre periférica y linfocitos CD4+ proveniente de pacientes con AR, en comparación con células derivadas de donadores sanos.
2. Este efecto parece depender de la secreción diferencial de IL-2, entre células de donadores y pacientes.
3. Asimismo, tanto el nivel de proliferación celular como la secreción de IL-2 se correlacionaron de manera positiva con la actividad clínica (DAS28) de la enfermedad.
4. La incubación *in vitro* de leptina indujo el aumento de los niveles en superficie de su receptor ObRb, en niveles similares entre donadores y pacientes.
5. Se confirmó que la incubación de linfocitos T CD4+ indujo la activación de la vía canónica de STAT3, aunque no se observaron diferencias de fosforilación entre las células de donadores y pacientes.
6. Asimismo, se observó que leptina promovió la activación celular incrementando los niveles de CD69 y CD25, siendo este último mayor el efecto en células de pacientes.
7. La incubación de leptina promovió la secreción de IL-1 $\beta$  y de TNF $\alpha$ , sugiriendo un efecto pro-inflamatorio. y el estímulo de Adiponectina de IL-6 y TNF $\alpha$ ., de manera diferencial entre donadores sanos y pacientes con AR.
8. Adicionalmente, se confirmó que la incubación con leptina tuvo un efecto protector de la apoptosis inducida por etopósido.
9. Por su parte, la adiponectina promovió un efecto similar a la leptina: estimulando la proliferación, secreción de IL-2, expresión de marcadores de activación (CD25 y CD69) y rescate de la apoptosis inducida por etopósido. Sin embargo, su efecto parece no mostrar diferencia entre células de donadores y pacientes.

10. Asimismo, la incubación con adiponectina, a diferencia de la leptina, indujo un incremento en la secreción de IL-6; confirmando un efecto pro-inflamatorio a esta adipocitocina.
11. Por su parte, la leptina fue capaz de inducir la sobreexpresión del factor de transcripción ROR $\gamma$ T y la inducción de secreción de IL-17 en una población de linfocitos T CD4+, sugiriendo su diferenciación al fenotipo Th17.
12. Por otra parte, los niveles circulantes de leptina y resistina se correlacionaron significativamente con la actividad clínica, observación que no ocurrió para adiponectina.
13. Por su parte, se pudo observar una correlación positiva significativa entre los niveles de leptina, resistina, IL-6 e IL-17 se correlacionaron positivamente con la actividad clínica de los pacientes con AR de una manera independiente del IMC.
14. Estos resultados sugieren la existencia de varios mecanismos biológicos para explicar un efecto pro-inflamatorio de las adipocitocinas leptina y adiponectina, sobre las células mononucleares y, sobre todo, los linfocitos T CD4<sup>+</sup>.
15. Desde que el efecto de la leptina, aparentemente, fue mayor para las células de pacientes con AR, sugerimos que estas células muestran un umbral de activación más bajo y, por lo tanto, los efectos, particularmente, de leptina podrían ser mayores.



## 9. PERSPECTIVAS

1. Con el objetivo de encontrar asociaciones significativas entre los parámetros clínicos y los fenómenos *in vitro*, se propone incrementar el número de pacientes y donadores incluidos en este estudio.
2. Evaluar las isoformas de adiponectina presentes en sangre y líquido sinovial de los pacientes.
3. Evaluar el tipo y función de los receptores de adiponectina presentes en células control y activadas.
4. Elucidar las vías de señalización utilizadas por las adipocitocinas que desencadena la respuesta diferencial entre pacientes con AR y donadores sanos.
5. Estudiar los procesos desencadenantes de las adipocitocinas en otras poblaciones celulares.

## 10. REFERENCIAS

- Abbas A., L. P. (1999). *Inmunología celular y molecular*. Elsevier España, S.L.
- Agrawal S, G. S. (2011). Leptin activates human B cells to secrete TNF-alpha, IL-6, and IL-10 via JAK2/STAT3 and p38MAPK/ERK1/2 signaling pathway. *J Clin Immunol* 31, 472-8. .
- Alamanos, Y. P. (2006). Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum* 36(3), 182-188.
- Albani, S. a. (1992). Molecular basis for the association between HLA DR4 and rheumatoid arthritis. From the shared epitope hypothesis to a peptidic model of rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 25(3): , 209-212.
- Alberti L, G. L. (2007). Adiponectin receptors gene expression in lymphocytes of obese and anorexic patients. *Diabetes Obes Metab.* (9)3, 344-349.
- Aleffi, S. I. (2005). Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 42(6): , 1339-1348.
- Alm, A. S. (2010). Varying susceptibility of pulmonary cytokine production to lipopolysaccharide in mice. *Cytokine* 49(3): , 256-263.
- Arita, Y. S. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257(1): , 79-83.
- Axelsson, J. O. (2005). Adipose tissue and its relation to inflammation: the role of adipokines. *J Ren Nutr* 15(1):, 131-136.
- Batra, A. M. (2005). The role of leptin in the immune system a linking of endocrinology and immunology. *Dtsch Med Wochenschr* 130(5):, 226-229.
- Batún Garrido J, S. M. (2018). Relación entre las concentraciones de la leptina y la actividad de la enfermedad en pacientes con artritis reumatoide. *Mdicina clínica* (150)9, 341-344 .
- Bays, H. L. (2004). Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab* 89(2): , 463-478.
- Beyaert, R. K.-O. (1991). Lithium chloride potentiates tumor necrosis factor-induced and interleukin 1-induced cytokine and cytokine receptor expression. *Cytokine* 3(4): , 284-291.

- Bingham, C. O. (2002). The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Rheumatol Suppl* 65:, 3-9.
- Bokarewa, M. D. (2003). Leptin consumption in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 62(10), 952-956.
- Bokarewa, M. I. (2005). Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* 174(9): , 5789-5795.
- Brichard, S., & Delporte, M. y. (2003). Adipocytokines in anorexia nervosa: a review focusing on leptin and adiponectin. . *Horm Metab Res*, 35: , 337-342.
- Canete, J. D. (2000). Differential Th1/Th2 cytokine patterns in chronic arthritis: interferon gamma is highly expressed in synovium of rheumatoid arthritis compared with seronegative spondyloarthropathies. *Ann Rheum Dis* 59(4):, 263-268.
- Capeau, J. (2007). The story of adiponectin and its receptors AdipoR1 and R2: to follow. . *J Hepatol*, 47: , 736-738.
- Cardiel, M. H.-S. (2002). Community based study to estimate prevalence, burden of illness and help seeking behavior in rheumatic diseases in Mexico City. A COPCORD study. *Clin Exp Rheumatol* 20(5): , 617-624.
- Casanueva, F. F. (1999). Growth Hormone Secretagogues: Physiological Role and Clinical Utility. *Trends Endocrinol Metab* 10(1): , 30-38.
- Cha S, C. C. (2007). Association of anti-cyclic citrullinated peptide antibody levels with PADI4 haplotypes in early rheumatoid arthritis and with shared epitope alleles in very late rheumatoid arthritis . *Arthritis Rheum* 56: , 1454-1463.
- Chawla A, N. K. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 11, 738–749.
- Chawla A, N. K. (2011). Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. . *Nat Rev Immunol*;11:, 738–49.
- Chen D.Y., C. Y. (2011). Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF-alpha therapy. *Arthritis Res Ther*, 13 , 126.
- Chen, M. Y. (2008). ADMA induces monocyte adhesion via activation of chemokine receptors in cultured THP-1 cells. *Cytokine* 43(2): , 149-159.
- Chen, T. H. (2006). Evidence for a protective role for adiponectin in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* 1762(8):, 711-718.

- Choy, E. H. (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 344(12): , 907-916.
- Cisneros Caballero A, F. P. (2017 ). Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis: towards biotechnological therapies. *Investigación en Discapacidad* 6(2), 69-87.
- Clegg, D. O. (1987). Diagnostic criteria in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol Suppl* 65:, 3-11.
- Comuzzie, A. G. (2001). The genetic basis of plasma variation in adiponectin, a global endophenotype for obesity and the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 86(9): , 4321-4325.
- Corl, F. M. (2002). A five-step approach to digital image manipulation for the radiologist. *Radiographics* 22(4): , 981-992.
- Correa, T. G. (2004). Anticuerpos anti-CCP en artritis reumatoidea: relación con características clínicas, citocinas Th1/Th2 y HLA-DRB1. *Biomedica*, 140-152.
- Da Silva SV, S. C.-M.-N. (2013). Increased leptin response and inhibition of apoptosis in thymocytes of young rats offspring from protein deprived dams during lactation. *PLoS ONE* 8(5).
- Del Rincon, I. a. (1999). HLA-DRB1 alleles associated with susceptibility or resistance to rheumatoid arthritis, articular deformities, and disability in Mexican Americans. *Arthritis Rheum* 42(7): , 1329-1338.
- Deleuran, B. W. (1992). Localization of tumor necrosis factor receptors in the synovial tissue and cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. Implications for local actions of tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 35(10): , 1170-1178.
- Deng J, L. Y. (2012). Leptin exacerbates collagen-induced arthritis via enhancement of Th17 cell response. . *Arthritis Rheum* 64, 3564–3573.
- Dessein P.H, N. G. (2014). Age impacts on the independent relationships of leptin with cardiometabolic risk and surrogate markers of enhanced early atherogenesis in black and white patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Rheumatol Int*, 34, 329-339.
- Diez, J. J. (2003). The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 148(3): , 293-300.
- Duan C, L. M. (2004). SH2-B promotes insulin receptor substrate (IRS)- and IRS2-mediated activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in response to leptin. . *JBiol Chem*; 279: , 43684-43691. .

- Dusserre, E. P. (2000). Differences in mRNA expression of the proteins secreted by the adipocytes in human subcutaneous and visceral adipose tissues. *Biochim Biophys Acta* 1500(1): , 88-96.
- El-Haschimi K, L. X. (2006). Leptin receptor expression and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high-fat diet in mice. *J Immunol* 176, 7745–7752.
- F Vera, P. J.-C.-F.-G. (2018). Obesity, Fat Mass and Immune System: Role for Leptin. *Frontiers in Physiology*, 640.
- Fabris, M. E. (2002). TNF- alpha gene polymorphisms in rheumatoid arthritis patients treated with anti-TNF-alpha agents: preliminary results. *Reumatismo* 54(1): , 19-26.
- Faggioni, R. J.-C. (2000). Leptin-deficient (ob/ob) mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(5): , 2367-2372.
- Fantuzzi, G. (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115(5): , 911-919 .
- Fantuzzi, G. (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. . *J Allergy Clin Immunol*, 115: , 911-919.
- Feldmann, M. (2001). Gene therapy for rheumatoid arthritis? *J Clin Invest* 107(11): , 1353.
- Feldmann, M. (2001). Pathogenesis of arthritis: recent research progress. *Nat Immunol* 2(9): 771-773., 771-773.
- Feldmann, M. a. (1999). The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 38., 3-7.
- Feldmann, M. a. (2001). Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol* 19: , 163-196.
- Feldmann, M. F. (2001). Analysis of cytokine expression in rheumatoid synovium has provided new insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis and new therapeutic opportunities. *Transplant Proc* 33(3): , 2085-2086.
- Feldmann, M. F. (2001). The role of TNF alpha and IL-1 in rheumatoid arthritis. *Curr Dir Autoimmun* 3: , 188-199.
- Fernandez-Riejos P, N. S.-A.-R.-P.-Y. (2010). Role of leptin in the activation of immune cells. . *Mediators of inflammation*, 568343.

- Forsblad d'Elia H., P. R. (2008). Resistin in serum is associated with higher levels of IL-1Ra in post-menopausal women with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 47, 1082-1087.
- Fried, S. K. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 83(3): , 847-850.
- Fruhbeck, G. J.-A. (2001). The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280(6): , 827-847.
- Fujisaka S, U. I. (2009). Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* 58, 2574–82.
- Fujisaka S, U. I. (2009). Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. . *Diabetes*;58:, 2574–2582.
- Fujita Y, M. M. (2002). Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. . *Clin Ex Immunol* 128, 21–26.
- Fujita, Y. M. (2001). Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 128(1): , 21-26.
- G., F. (2009). Three questions about leptin and immunity. *Brain Behav Immun* 23, 405–410.
- Gainsford T1, W. T. (1996). Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc. Natl Acad. Sci* 10;93(25):14564-8., 14564-14568.
- Garland, B. a. (2006). Cognitive neuroscience and the law. *Curr Opin Neurobiol* 16(2): , 130-134.
- Goldstein, B. J. (2004). (2004). "Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): , 2563-2568.
- Gomez. (2005). Anticuerposanti-PCC: nuevos autoanticuepos en la artritis reumatoide. *Revista Española de Reumatología* , 32.
- González, J. (2007). "Correlación entre los niveles de la Adipocitocina Leptina y el grado de actividad de Artritis Reumatoide humana." Tesis para obtener el Título en Licenciatura en Farmacia. Tesis para obtener el Título en Licenciatura en Farmacia.

- Gourraud, P. A. (2007). A new classification of HLA-DRB1 alleles differentiates predisposing and protective alleles for autoantibody production in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 9(2): , 27.
- Gregersen, P. K. (1987). The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 30, 1205–1213 .
- Guzik, T. J. (2006). Adipocytokines-novel link between inflammation and vascular function? *J Physiol Pharmacol* 57(4): 505-528., 505-528.
- Haringman, J. J. (2004). Chemokine blockade: a new era in the treatment of rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther* 6(3): , 93-97.
- Haugen, F. a. (2007). Activation of nuclear factor-kappaB by high molecular weight and globular adiponectin. *Endocrinology* 148(11): , 5478-5486.
- Havel, P. (2004). Update on Adipocyte Hormones: Regulation of Energy Balance and Carbohydrate/Lipid Metabolism. . *Diabetes*, 53: S143-S151., S143-S151.
- Hegyí, K. K. (2004). Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol Int* 28(3): , 159-169.
- Hill, J. A. (2003). Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1\*0401 MHC class II molecule. *J Immunol* 171(2): , 538-541.
- Hirano, T. K. (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 324(6092): , 73-76.
- Hoang Van Tong, N. K. (2017). Adiponectin and pro-inflammatory cytokines are modulated in Vietnamese patients with type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Investig* 8(3):, 295–305.
- Hoffman, I. E. (2005). Diagnostic performance and predictive value of rheumatoid factor, anti-citrullinated peptide antibodies, and the HLA shared epitope for diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 51(1): , 261-263.
- Hoffman, R. W. (1997). Mycoplasma infection and rheumatoid arthritis: analysis of their relationship using immunoblotting and an ultrasensitive polymerase chain reaction detection method. *Arthritis Rheum* 40(7): 1219-1228., 1219-1228.
- Hosoda, H. M. (2003). Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. *J Biol Chem* 278(1): , 64-70.

- Hovdenes, J. T. (1990). IL-6 in synovial fluids, plasma and supernatants from cultured cells of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Scand J Rheumatol* 19(3): , 177-182.
- Hsing, C. H. (2008). The distribution of interleukin-19 in healthy and neoplastic tissue. *Cytokine* 44(2): , 221-228.
- Hu, W. L. (2007). Decreased C-reactive protein-induced resistin production in human monocytes by simvastatin. *Cytokine* 40(3): , 201-206.
- Hughes-Austin JM, D. K. (2018). Plasma adiponectin levels are associated with circulating inflammatory cytokines in autoantibody positive first-degree relatives of rheumatoid arthritis patients. *PLoS ONE* 13(6), e0199578.
- Hyun-Mi Choi, Y.-A. L.-H.-J.-H.-Y.-I. (2009). Adiponectin may contribute to synovitis and joint destruction in rheumatoid arthritis by stimulating vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase-1, and matrix metalloproteinase-13 expression in fibroblast-like synoviocytes more than proin. *Arthritis Research & Therapy* 11(6).
- Janeway C, T. P. (2005). Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. ." *Garland Science Publishing*.
- Kamoun, M. (2005). Diagnostic performance and predictive value of anti-citrullinated peptide antibodies for diagnosis of rheumatoid arthritis: toward more accurate detection? *Clin Chem* 51(1): , 12-13.
- Kanda, H. S. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116(6): , 1494-1505.
- Kang Y, H. P. (2013). Adipokines, inflammation, insulin resistance, and carotid atherosclerosis in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 15 , 194.
- Kaser, S. A. (2003). Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 309(2): , 286-290.
- Kawahata, K. (2009). Historical review of rheumatology and future directions. *Nippon Rinsho* 67(3): , 445-457.
- Keustermans G, v. d. (2017). Differential adipokine receptor expression on circulating leukocyte subsets in lean and obese children. *J Diabetes Investig* (8)3, 295–305.



- Kim SY, L. J. (2010). Preferential effects of leptin on CD4 T cells in central and peripheral immune system are critically linked to the expression of leptin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Kim, K. B., & Bae, S. (2017 ). Update on the genetic architecture of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 13, 13-24 .
- Kishi T, E. J. (2005). Body weight is regulated by the brain: a link between feeding and emotion. . *Mol Psychiatry* 10(2):, 132-146.
- Klareskog, L. L. (2007). Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* 19(1): , 49-54.
- Klareskog, L. P. (2006). A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 54(1): 38-46., 38-46.
- Klein-Wieringa I.R., V. d. (2011). Baseline serum adipokine levels predict radiographic progression in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 63 , 2567-2574.
- Kong, Y. Y. (1999). Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 402(6759): , 304-309.
- Koster A, S. S. (2010). Body fat distribution and inflammation among obese older adults with and without metabolic syndrome. *Obesity* 18, 2354–61.
- Koster A, S. S. (2010). Body fat distribution and inflammation among obese older adults with and without metabolic syndrome. *Obesity* 2010;18:, 2354–2361.
- Kotake, S. N. (1999). IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 103(9): , 1345-1352.
- Kremer, J. (2005). Is the outcome of rheumatoid arthritis changed with the use of new disease-modifying antirheumatic drugs? *Arthritis Rheum* 53(5): 636-638., 636-638.
- Kroot, E. J. (2000). The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43(8): , 1831-1835.
- Lee H, I. P. (2007). Interaction between smoking, the shared epitope, and anti-cyclic citrullinated peptide: a mixed picture in three large North American rheumatoid arthritis cohorts. *Arthritis Rheum* 56, 1745–1753.
- Lee Y.A., C. H. (2012). Synergy between adiponectin and interleukin-1beta on the expression of interleukin-6, interleukin-8, and cyclooxygenase-2 in fibroblast-like synoviocytes. *Exp Mol Med*, 44 , 440-447.

- Lee, D. M. (2003). Clinical utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 62(9): , 870-874.
- Lee, H. S. (2013). An association analysis of HLA-DRB1 with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of \*09:01 allele on disease phenotypes. *Rheumatology (Oxford)* 52 (7), 1172-1182.
- Lee, S. W. (2008). Adiponectin mitigates the severity of arthritis in mice with collagen-induced arthritis. *Scand J Rheumatol* 37(4):, 260-268.
- Lehrke, M. M. (2004). An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. *PLoS Med* 1(2): , e45.
- Lenz, T. L. (2015). Widespread non-additive and interaction effects within HLA loci modulate the risk of autoimmune diseases. *Nat. Genet.* 47, 1085–1090 .
- Li F, G. J. (2014). Polymorphisms in the TNF- $\alpha$ , TNFR1 gene and risk of rheumatoid arthritis in Chinese Han population. *Int J Immunogenet* 41(6), 499-502.
- Li, H. a. (2008). Positive and negative signaling components involved in TNF $\alpha$ -induced NF-kappaB activation. *Cytokine* 41(1): , 1-8.
- Li, J. H. (2010). Impaired IL-7 signaling may explain a case of atypical JAK3-SCID. *Cytokine* 49(2):, 221-228.
- Li, J. J. (2009). Chronic inflammatory status in patients with coronary artery ectasia. *Cytokine* 46(1):, 61-64.
- Li, L. G. (2009). The adipose triglyceride lipase, adiponectin and visfatin are downregulated by tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in vivo. *Cytokine* 45(1): , 12-19.
- Li, X. (2008). Act1 modulates autoimmunity through its dual functions in CD40L/BAFF and IL-17 signaling. *Cytokine* 41(2): , 105-113.
- Li, X. S. (2010). Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine* 49(1): , 1-9.
- Li, Z. D. (2009). Identification and characterization of human ARIP2 and its relation to breast cancer. *Cytokine* 46(2): , 251-259.
- Liboni, K. N. (2004). Mechanism of glutamine-mediated amelioration of lipopolysaccharide-induced IL-8 production in Caco-2 cells. *Cytokine* 26(2): , 57-65.

- Lisignoli, G. S. (2002). Different chemokines are expressed in human arthritic bone biopsies: IFN-gamma and IL-6 differently modulate IL-8, MCP-1 and rantes production by arthritic osteoblasts. *Cytokine* 20(5): , 231-238.
- Liu, L. P. (2008). Leptin increases in Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) disease and promotes cell proliferation and inflammatory cytokine secretion. *Br J Ophthalmol* 92(4):, 557-561.
- Lord GM, M. G. (1998). Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394, 897–901.
- Lord, G. (2002). Role of leptin in immunology. *Nutr Rev* 60(10 Pt 2): , S35-38; discussion S68-84, 85-37.
- Lord, G. M. (1998). Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394(6696): , 897-901.
- Lu, J. H. (2005). Interleukin-12 p40 promoter activity is regulated by the reversible acetylation mediated by HDAC1 and p300. *Cytokine* 31(1): , 46-51.
- Lubberts, E. a. (2003). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis. *Adv Exp Med Biol* 520: , 194-202.
- Luo, Y. L. (2016). Adiponectin: a versatile player of innate immunity. *Journal of Molecular Cell Biology*.
- Maedler K., S. P. (2004). Leptin modulates beta cell expression of IL-1 receptor antagonist and release of IL-1beta in human islets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 , 8138-8143.
- Makrygiannakis, D. E. (2006). Citrullination is an inflammation-dependent process. *Ann Rheum Dis* 65(9): , 1219-1222.
- Malfait, A. M. (2001). Chronic relapsing homologous collagen-induced arthritis in DBA/1 mice as a model for testing disease-modifying and remission-inducing therapies. *Arthritis Rheum* 44(5): , 1215-1224.
- Martin-Romero, C. J.-A. (2000). Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. *Cell Immunol* 199(1): , 15-24.
- Matarese, G. S. (2005). Leptin in immunology. *J Immunol* 174(6): , 3137-3142.
- Mateo Silleras B, M. d. (2004). Neurobiología de los trastornos de la conducta alimentaria. In: Miján de la Torre A, editor. Nutrición y metabolismo en trastornos de la conducta alimentaria. . *Barcelona*;, 93-121.

- Matsui, T. K. (2006). Diagnostic utility of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies for very early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 33(12): , 2390-2397.
- Mattioli B, G. L. (2009). Leptin exerts an anti-apoptotic effect on human dendritic cells via the PI3K-Akt signalling pathway. *FEBS Lett* 583, 1102–1106. .
- Mattioli B, S. E. (2005). Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. *J Immunol* 174, 6820–6828.
- Mattioli, B. E. (2005). Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. *J Immunol* 174(11): , 6820-6828.
- McInnes, I. B. (2007). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7(6): , 429-442.
- McTernan, C. L. (2002). Resistin, central obesity, and type 2 diabetes. *Lancet* 359(9300): , 46-47.
- Menard, H. A. (2000). Insights into rheumatoid arthritis derived from the Sa immune system. *Arthritis Res* 2(6): , 429-432.
- Michou, L. S. (2007). Linkage proof for PTPN22, a rheumatoid arthritis susceptibility gene and a human autoimmunity gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(5): , 1649-1654.
- Migita K, M. Y. (2006 ). The serum levels of resistin in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol*24(6):, 698-701.
- Migita, K. Y. (2006). The serum levels of resistin in rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 24(6): , 698-701.
- Mock, B. A. (1989). The murine Il-6 gene maps to the proximal region of chromosome 5. *J Immunol* 142(4): , 1372-1376.
- Mora, S. a. (2002). An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking. *Diabetes Metab Res Rev* 18(5): , 345-356.
- Moreno-Aliaga MJ, C. J. (2005). Adiposity and proinflammatory state: the chicken or the egg. . *Adipocytes* 1, , 1–16.
- Myasoedova E, D. J. (2010 12(5)). Epidemiology of rheumatoid arthritis: rheumatoid arthritis and mortality 12(5):379-85. *Curr Rheumatol Rep*, 379-85.
- Nakashima, K. M. (1997). Overlapping and distinct signals through leptin receptor (OB-R) and a closely related cytokine signal transducer, gp130. *FEBS Lett* 401(1):, 49-52.

- Nawata, Y. E. (1989). IL-6 is the principal factor produced by synovia of patients with rheumatoid arthritis that induces B-lymphocytes to secrete immunoglobulins. *Ann N Y Acad Sci* 557, 230-238, discussion 239.
- Nell, V. P. (2005). Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64(12): , 1731-1736.
- Neumann E, F. K.-L. (2011). Adipocytokines as driving forces in rheumatoid arthritis and related inflammatory diseases? . *Arthritis Rheum.* 63(5):, 1159–1169.
- O'Rourke RW, W. A. (2011). Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. . *Diabetologia*;54:, 1480–1490.
- O'Rourke RW, W. A. (2011;54). Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. *Diabetologia* , 1480–1490.
- Okada Y, W. D. (2014). Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 506, 376–381.
- Okada, Y. (2013). Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 506, 376–381 .
- Olama S.M, S. M. (2012). Synovial/serum leptin ratio in rheumatoid arthritis: the association with activity and erosion. *Rheumatol Int*, 32 , 683-690.
- Otero M, L. R.-R. (2006). Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 65 , 1198-1201.
- Otero, M. R. (2005). Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Lett* 579(2): , 295-301.
- Otero, M. R. (2006). Changes in plasma levels of fat-derived hormones adiponectin, leptin, resistin and visfatin in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 65(9): , 1198-1201.
- Otero, M. R. (2006). Leptin: a metabolic hormone that functions like a proinflammatory adipokine. *Drug News Perspect* 19(1): , 21-26.
- Otero, M. R. (2006). Towards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin. *Rheumatology (Oxford)* 45(8): , 944-950.
- Ouchi, N. S. (1999). Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100(25): , 2473-2476.

- Ouchi, N. S. (2001). Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103(8): , 1057-1063.
- Ounissi-Benkalha, H. J. (1996). In vitro effects of 2 antirheumatic drugs on the synthesis and expression of proinflammatory cytokines in synovial membranes from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 23(1):, 16-23.
- Pan, Y. X. (2007). Exercise training prevents arterial baroreflex dysfunction in rats treated with central angiotensin II. *Hypertension* 49(3): , 519-527.
- Park KG, P. K. (1999). Paradoxical decrease of an adipocyte specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 257: , 79–83.
- Patel, J. V. (2009). Circulating levels of adiponectin, leptin, and tumour necrosis factor alpha in hypertension. *Ann Med* 41(4):, 291-300.
- Paula A. Correa, G. J.-C. (2004). Anticuerpos anti-CCP en artritis reumatoidea: relación con características clínicas, citocinas Th1/Th2 y HLA-DRB1. *Cytokine* 24: , 140-152.
- Pickens, S. R. (2010). IL-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 184(6): , 3233-3241.
- Pool, A. J. (2001). The effects of exercise on the hormonal and immune systems in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 40(6): , 610-614.
- Popa, C. M. (2005). Markers of inflammation are negatively correlated with serum leptin in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64(8): , 1195-1198.
- Rafail S, R. K. (2008). Leptin induces the expression of functional tissue factor in human neutrophils and peripheral blood mononuclear cells through JAK2-dependent mechanisms and TNF- $\alpha$  involvement. *Thromb Res* 122, 366–375.
- Raso GM, P. M. (2002). Leptin potentiates IFN-gamma induced expression of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 in murine macrophage J774A. *Br J Pharmacol* 137, 799–804.
- Reynolds, R. J. (2014). HLA-DRB1-associated rheumatoid arthritis risk at multiple levels in African Americans: hierarchical classification systems, amino acid positions, and residues. *Arthritis Rheumatol* 66, 3274–3282 .
- Riminucci, M. S. (2003). Osteoclastogenesis in fibrous dysplasia of bone: in situ and in vitro analysis of IL-6 expression. *Bone* 33(3): , 434-442.

- Ringwood, L. a. (2008). The involvement of the interleukin-1 receptor-associated kinases (IRAKs) in cellular signaling networks controlling inflammation. *Cytokine* 42(1): , 1-7.
- Ruiz Benito, A. P. (2001). "¿Por qué un tratamiento precoz en la artritis reumatoide?" . *MEDIFAM* 11: , 335-341.
- Safaya, S. E. (2009). Effect of sodium butyrate on lung vascular TNFSF15 (TL1A) expression: differential expression patterns in pulmonary artery and microvascular endothelial cells. *Cytokine* 46(1): , 72-78.
- Sailhamer, E. A. (2010). Hypoxic "second hit" in leukocytes from trauma patients: Modulation of the immune response by histone deacetylase inhibition. *Cytokine* 49(3): , 303-311.
- Sakito S., U. Y. (1995). Serum cytokines in patients with rheumatoid arthritis. Correlation of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha with the characteristics of peripheral blood mononuclear cells. *Rheumatol Int*, 15 , 31-37.
- Sánchez-Muñoz F, G.-M. R.-A. (2005). Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune. *Gaceta Medica Mexico* 141(6): , 505-511.
- Sánchez-Muñoz F., G.-M. R.-A. (2005). Adipocinas, tejido adiposo y su relación con células del sistema inmune . *Gaceta Medica Mexico* 141(6): , 505-515.
- Sánchez-Muñoz, F. G.-M.-A. (2005). Adipocytokines, adipose tissue and its relationship with immune system cells. . *Gaceta médica de México*, 141(6), , 505-512.
- Saucillo DC, G. V. (2014 ). Leptin metabolically licenses T cells for activation to link nutrition and immunity. . *J Immunol* 192, 136–44.
- Schellekens, G. A. (1998). Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 101(1): , 273-281.
- Scherer, P. E. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270(45):, 26746-26749.
- Schett, G. K. (1998). Enhanced expression of heat shock protein 70 (hsp70) and heat shock factor 1 (HSF1) activation in rheumatoid arthritis synovial tissue. Differential regulation of hsp70 expression and hsf1 activation in synovial fibroblasts by proinflammatory cytokines, s. *J Clin Invest* 102(2): , 302-311.

- Schwartz, M. W. (1997). Evidence that plasma leptin and insulin levels are associated with body adiposity via different mechanisms. *Diabetes Care* 20(9): , 1476-1481.
- Sebbag, M. M. (1995). The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* 95(6): , 2672-2679.
- Senolt L., H. D. (2007). Resistin in rheumatoid arthritis synovial tissue, synovial fluid and serum. *Ann Rheum Dis*, 66 , 458-463.
- Senolt, L. D. (2007). Resistin in rheumatoid arthritis synovial tissue, synovial fluid and serum. *Ann Rheum Dis* 66(4): , 458-463.
- Senolt, L. K. (2006). Increased adiponectin is negatively linked to the local inflammatory process in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine* 35(5-6): , 247-252.
- Serelis, J. M. (2008). Effect of anti-TNF treatment on body composition and serum adiponectin levels of women with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 27(6): , 795-797.
- Shingu, M. Y. (1993). The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 94(1): , 145-149.
- Shoda, H. a. (2007). Molecular pathogenesis of rheumatoid arthritis--the roles of synovial cells, immune cells, and pro-inflammatory cytokines. *Nippon Rinsho* 65(7): , 1164-1166.
- Si, H. F. (2008). Suppressive effect of leflunomide on rat hepatic stellate cell proliferation involves on PDGF-BB-elicited activation of three mitogen-activated protein kinases. *Cytokine* 42(1): , 24-31.
- Silswal, N. A. (2005). Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 334(4): , 1092-1101.
- Steppan, C. M. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409(6818): , 307-312.
- St-Pierre J, T. M. (2012). Modulation of leptin resistance by protein tyrosine phosphatases. *Cell Metab* 15, 292–297.
- St-Pierre J, T. M. (2012). Modulation of leptin resistance by protein tyrosine phosphatases. . *Cell Metab.*;15.; 292–297.



- Su, C.-M. H.-J.-H.-Y.-W.-H. (2015). Resistin Promotes Angiogenesis in Endothelial Progenitor Cells Through Inhibition of MicroRNA206: Potential Implications for Rheumatoid Arthritis. *STEM CELLS* 33(7); 2243–2255.
- Tai ES, L. T. (2000). Body fat distribution and cardiovascular risk in normal weight women. Associations with insulin resistance, lipids and plasma leptin. . *J. Obes Relat Metab Disord*;24.; 751-757.
- Tan, W. F. (2009). High adiponectin and adiponectin receptor 1 expression in synovial fluids and synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 38(6); 420-427.
- Tanabe, O. S. (1988). Genomic structure of the murine IL-6 gene. High degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human. *J Immunol* 141(11): , 3875-3881.
- Tang, C. H. (2007). Adiponectin enhances IL-6 production in human synovial fibroblast via an AdipoR1 receptor, AMPK, p38, and NF-kappa B pathway. *J Immunol* 179(8): , 5483-5492.
- Targonska-Stepniak, B. M. (2008). Leptin serum levels in rheumatoid arthritis patients: relation to disease duration and activity. *Rheumatol Int* 28(6): , 585-591.
- Targonska-Stepniak, B. M. (2010). Adiponectin and leptin serum concentrations in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 30(6): , 731-737.
- Tartaglia, L. A. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83(7): , 1263-1271.
- Tasaka, S. N. (2010). Elevated serum adiponectin level in patients with Mycobacterium avium-intracellulare complex pulmonary disease. *Respiration* 79(5): , 383-387.
- Tian X, -Q. Y.-J.-S.-D.-P.-H. (2016). Globular Adiponectin Inhibits the Apoptosis of Mesenchymal Stem Cells Induced by Hypoxia and Serum Deprivation via the AdipoR1-Mediated Pathway. *Cell Physiol Biochem* 38, 909-925.
- Tian, Z. R. (2002). Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. *Biochem Biophys Res Commun* 298(3); 297-302.
- Tilg, H. a. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6(10); 772-783.

- Trujillo ME, S. P. (2006 ). Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev* 27, 762–778.
- Trujillo ME, S. P. (2006). Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. . *Endocr Rev*; 27:, 762–778.
- van der Elst K1, M. S. (2016 68(9)). Unraveling Patient-Preferred Health and Treatment Outcomes in Early Rheumatoid Arthritis: A Longitudinal Qualitative Study. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 1278-87.
- Van der Helm-van Mil, A. H. (2005). Understanding the genetic contribution to rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 17(3): , 299-304.
- Van Gestel A.M., P. M. (1996). Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. Comparison with the preliminary American College of Rheumatology and the World Health Organization/International League Against Rheumatism Cri. *Arthritis Rheum*, 39 , 34-40.
- Van Snick, J. (1990). Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 8: , 253-278.
- Velloso LA, S. W. (2009). Leptin action in the thymus. . *Ann N Y Acad Sci* 1153, 29–34.
- Verma, S. S. (2003). Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 108(6): , 736-740.
- Villaseñor. (2002). El papel de la leptina en el desarrollo de la obesidad. *Rev Endocrinol Nutr* 10(3): , 135-139.
- Vinasco, J. Y. (1997). Polymorphism at the TNF loci in rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 49(1): , 74-78.
- Volk, T. M. (2000). Secretion of MCP-1 and IL-6 by cytokine stimulated production of reactive oxygen species in endothelial cells. *Mol Cell Biochem* 206(1-2):, 105-112.
- Vossenaar, E. R. (2004). The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum* 50(11):, 3485-3494.
- Voulgari, P. V. (1999). Role of cytokines in the pathogenesis of anemia of chronic disease in rheumatoid arthritis. *Clin Immunol* 92(2): , 153-160.
- Wang, H. W. (2002). Human resistin gene: molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in Caucasians." . *J Clin Endocrinol Metab* 87(6): , 2520-2524.

- Wei Yu, W. T. (2014). Modulatory Effect of Adiponectin on Apoptosis and Proliferation of Synovial Fibroblasts from Rheumatoid Arthritis Patients. *2014 ACR/ARHP Annual Meeting*, (pág. ABSTRACT 1046).
- Wei, Y. A.-C. (2009). Mineralocorticoid receptor antagonism attenuates vascular apoptosis and injury via rescuing protein kinase B activation. *Hypertension* 53(2): , 158-165.
- Wellen, K. E. (2003). Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 112(12): , 1785-1788.
- Welsing and V. G. A. PMJ, S. H. (2001). The relationship between disease activity, joint destruction, and functional capacity over the course of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44(9): , 2009-2017.
- Wensveen F.M. (2015) NK cells link obesity-induced adipose stress to inflammation. and insulin resistance *Nat Immunol*. 2015 Apr;16(4):376-85.
- Wilk S, S. C. (2014). Adiponectin is a negative regulator of antigen-activated T cells. *Eur J Immunol* 41(8), 2323-2332.
- Xibille-Friedmann D, B.-B. C.-G.-V.-H. (2010). Two-year follow-up of plasma leptin and other cytokines in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 69, 930-931.
- Xibille-Friedmann D., O.-P. E.-B.-R.-G.-H. (2015). Leptin and adiponectin as predictors of disease activity in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 33 , 471-477.
- Yamauchi T, N. Y.-I. (2007). Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 13, 332–339.
- Yamauchi T, N. Y.-I. (2007). Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. . *Nat Med*; 13; 332–339. .
- Yamauchi, T. J. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423(6941): , 762-769.
- Yang, Y. Y. (2009). STAT3 induces muscle stem cell differentiation by interaction with myoD. *Cytokine* 46(1): , 137-141.
- Yu, Y. Y. (2013). Cutting edge: Leptin-induced ROR $\gamma$ t expression in CD4<sup>+</sup> T cells promotes Th17 responses in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol* 190, 3054–3058.

- Zappala G., R. M. (2009). IGFBP-3, hypoxia and TNF-alpha inhibit adiponectin transcription. *Biochem Biophys Res Commun*, 382 , 785-789.
- Zarkesh-Esfahani H, P. A. (2004). Leptin indirectly activates human Neutrophils via induction of TNF- $\alpha$ . *J Immunol* 172, 1809–1814.
- Zauli, D. S. (2003). Prevalence of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 42(5): 696-697; *author reply* 697., 696-697.
- Zetoune, F. S. (2001). A20 inhibits NF-kappa B activation downstream of multiple Map3 kinases and interacts with the I kappa B signalosome. *Cytokine* 15(6): , 282-298.
- Zhang, Y. R. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372(6505): , 425-432.
- Zhao Y, S. R. (2003). Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 247–52.
- Zhu, L. J. (2010). Suppression of tumor necrosis factor receptor associated factor (TRAF)-2 attenuates the proinflammatory and proliferative effect of aggregated IgG on rat renal mesangial cells. *Cytokine* 49(2):, 201-208.
- Zwerina, J. K. (2005). Pathogenesis of rheumatoid arthritis: targeting cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 1051: , 716-729.





## Brief Report

## Peripheral blood Leptin and Resistin levels as clinical activity biomarkers in Mexican Rheumatoid Arthritis patients

Carolina Bustos Rivera-Bahena<sup>a,b</sup>, Daniel-Xavier Xibillé-Friedmann<sup>a,c</sup>, Judith González-Christen<sup>a</sup>, Sandra Miriam Carrillo-Vázquez<sup>d</sup>, José Luis Montiel-Hernández<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Mexico

<sup>b</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Mexico

<sup>c</sup>Hospital General de Cuernavaca "José G. Paredes", SSM, Mexico

<sup>d</sup>Hospital Regional 1°. Octubre, ISSSTE, D.F. Mexico, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 2 September 2015

Accepted 13 November 2015

Available online xxx

## Keywords:

Rheumatoid arthritis

Leptin

Resistin

Adiponectin

Pro-inflammatory cytokines

Clinical activity

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the association between the clinical activity of RA patients and serum adipocytokines (Leptin, Adiponectin and Resistin) and inflammatory cytokines.

**Methods:** All RA patients fulfilled ACR 1987 criteria and were treated with DMARDs. Adipocytokine and inflammatory cytokine levels were evaluated using ELISA.

**Results:** 121 patients were included in the study. Stratifying according to DAS28 (low, moderate and high activity), there were significant differences for Leptin, Resistin, IL-6 and IL-17, however, no differences were seen for Adiponectin, TNF $\alpha$  or IL-1 $\beta$ . Clinical activity positively correlated with Leptin, Resistin, IL-17 and IL-6 levels, but not with Adiponectin, TNF $\alpha$  or IL-1 $\beta$ . Adiponectin levels negatively correlated with TNF $\alpha$  and positively correlated with IL-1 $\beta$ . IL-1 $\beta$  positively correlated with IL-6 and negatively correlated with TNF $\alpha$  and IL-17.

**Conclusion:** Circulating Leptin, Resistin, IL-6 and IL-17 levels positively correlate with RA clinical activity in a manner independent of the subject's BMI. Complex relationships between inflammatory cytokines were observed in RA patients suggesting that other metabolic or inflammatory factors could be involved.

© 2015 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Reumatología y Colegio Mexicano de Reumatología. All rights reserved.

### Niveles en sangre periférica de Leptina y Resistina como biomarcadores de la actividad clínica de pacientes mexicanos con Artritis reumatoide

## RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar la asociación entre la actividad clínica de pacientes con Artritis reumatoide y adipocitocinas séricas (Leptina, Adiponectina y Resistina), citocinas inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN $\gamma$  e IL-17A).

**Métodos:** Se seleccionaron pacientes con AR (ACR 1987) tratados con FARMES. Los niveles de adipocitocinas y citocinas inflamatorias fueron evaluados por ELISA.

**Resultados:** 121 pacientes se incluyeron en el estudio. La actividad clínica correlacionó positivamente con Leptina, Resistina, IL-6 e IL-17 pero no para Adiponectina, TNF $\alpha$  o IL-1 $\beta$ . Los niveles de Adiponectina se asociaron negativamente con TNF $\alpha$  y positivamente con IL-1 $\beta$ . Por su parte, IL-1 $\beta$  se asoció de manera positiva con IL-6 y negativamente con TNF $\alpha$  e IL-17.

**Conclusión:** Los niveles circulantes de Leptina, Resistina, IL-6 e IL-17 se asociaron de manera positiva con la actividad clínica de pacientes con AR, independientemente del índice de masa corporal (IMC). Asimismo, en los pacientes con AR se observaron asociaciones complejas entre las adipocitocinas y citocinas, sugiriendo que otros factores tanto metabólicos como inflamatorios pudieran estar involucrados.

© 2015 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Reumatología y Colegio Mexicano de Reumatología. Todos los derechos reservados.

\* Corresponding author.

E-mail address: [jmontiel@uaem.mx](mailto:jmontiel@uaem.mx) (J.L. Montiel-Hernández).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reuma.2015.11.011>

1699-258X/© 2015 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Reumatología y Colegio Mexicano de Reumatología. All rights reserved.

**Por publicar:**

**Increased T cell proliferation and activation in Rheumatoid arthritis patients under *in vitro* leptin or adiponectin stimulation. Correlation with clinical activity**

Carolina BustosRivera-Bahena<sup>1,2</sup>, Daniel X. Xibillé-Friedmann<sup>3</sup>, Judith González-Christen<sup>4</sup>, Marisol Sandoval Rios<sup>1†</sup>, Verónica Marquez-Vergara<sup>1</sup> and Jose-Luis Montiel-Hernández<sup>1</sup>.

Affiliations:

<sup>1</sup>Citokine & Autoimmunity laboratory, Facultad of Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001 col. Chamilpa, C.P. 62209 Cuernavaca, México

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias, UAEM, Cuernavaca, Mexico

<sup>3</sup>Dept. Rheumatology, Hospital General de Cuernavaca “José G. Parres, SSM, Cuernavaca, México.

<sup>4</sup>Innate Immunity Laboratory, Facultad de Farmacia, UAEM, Cuernavaca, México.

† Actual adress (MSR): Depto. de Ciencias y Matemáticas. Centro Regional de Formación Docente e Investigación Educativa del Estado de Sonora

Corresponding Author: José-Luis Montiel-Hernández  
Facultad de Farmacia, UAEM  
Av. Universidad 1001 col. Chamilpa  
C.P. 62209, Cuernavaca, Morelos  
Phone: +52 777 3297000 ext. 3371  
Fax: +52 777 3297089