



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización y comparación de los perfiles de citoquinas entre pacientes colombianos con artritis reumatoidea de inicio temprano y artritis reumatoidea de inicio tardío

Vibian Angélica Coy Urrea

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina
Departamento de Medicina Interna, Servicio de Reumatología
Bogotá, Colombia
2015

Caracterización y comparación de los perfiles de citoquinas entre pacientes colombianos con artritis reumatoidea de inicio temprano y artritis reumatoidea de inicio tardío

Vibian Angélica Coy Urrea

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de:
Especialista en Reumatología

Director (a):
Doctor Antonio Iglesias Gamarra

Codirector (a):
Doctor Jorge Caminos Pinzón
Doctora Diana Gil Calderón

Línea de Investigación:
Artritis Reumatoidea

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de medicina
Departamento de Medicina, Servicio de Reumatología
Bogotá, Colombia
2015

A mis padres y hermanos, por su amor y comprensión

A mis amigos por su apoyo incondicional

*“Empieza por hacer lo necesario, luego lo que te es posible y un día acabarás
haciendo... lo imposible “*

San Francisco de Asís

Agradecimientos

Agradecimientos al Dr. Antonio Iglesias Gamarra y Dr. Federico Rondón Herrera, por sus observaciones, generosidad y apoyo para la elaboración de este trabajo.

Agradecimientos a mis compañeros de especialización actuales y previos por la recolección de pacientes, mantenimiento de bases de datos y colaboración.

Agradecimientos al Dr. Jorge Caminos Pinzón y su equipo de trabajo, por su orientación, toma, procesamiento y almacenamiento de muestras.

Agradecimientos a la Asociación Colombiana de Reumatología por los recursos para la elaboración del trabajo.

Y especialmente agradecimientos a la Dra. Diana Gil Calderón por su gran apoyo en el diseño y análisis estadístico.

Resumen

Introducción: La artritis reumatoidea (AR) es la enfermedad autoinmune con compromiso articular más frecuente en la población (1). Los pacientes con un inicio temprano de la enfermedad (inicio antes de los 65 años) se comportan de una forma diferente a los pacientes con inicio tardío (después de los 65 años) (5). Las citoquinas se han convertido en importantes blancos terapéuticos y son candidatas para biomarcadores de diagnóstico, seguimiento y pronóstico (3). **Objetivos:** Caracterizar y comparar los perfiles de citoquinas entre los pacientes con ARI temprano y ARI tardío y correlacionar los hallazgos con el DAS28VSG, DAS28PCR, VSG, PCR, Anti CCP y FR. **Metodología:** Estudio de corte transversal. Población: se evaluaron dos grupos de pacientes con ARI temprano y ARI tardío del servicio de reumatología de la Universidad Nacional de Colombia. Criterios de Inclusión: pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de AR evaluados clínica y serológicamente previo al inicio de terapia FARME con cuantificación de DAS28VSG, DAS28PCR, PCR, VSG, FR, Anti CCP, sin otra enfermedad autoinmune ni neoplasias. En quienes se cuantificaron niveles de IL1B, IL2, IL4, IL6, IL5, IL10, IL8, GM-CSF, INFg, TNFa mediante un ensayo de determinación múltiple de proteínas en fase sólida, (Human Cytokine 10-Plex Panel, Invitrogen Rev. 2.0). La descripción de las variables continuas se realizó según el resultado del test de normalidad de Shapiro Wilk como media y desviación estándar o mediana y rango intercuartil para variables normales y no- normales respectivamente. Las variables categóricas fueron descritas como números absolutos y porcentajes. Se compararon los perfiles de citoquinas entre los grupos de ARI temprano y ARI tardío utilizando U Mann-Whitney. Se estableció la correlación entre dos variables numéricas mediante el test de Pearson o Spearman. **Resultados:** en total ochenta pacientes fueron incluidos en el estudio, cuarenta y nueve pacientes de ARI tardío, y treinta y un pacientes de ARI temprano. Para los valores de DAS28VSG existe una diferencia estadísticamente significativa entre los 2 grupos. Por el contrario no existe diferencia significativa para DAS28PCR, PCR, títulos de Anti CCP ni títulos de FR. En la comparación entre las concentraciones de citoquinas de los 2 grupos, todas las citoquinas muestran una

diferencia significativa. Al realizar la correlación entre cada citoquina y las variables de interés se encuentran pocas correlaciones significativas. Para ARI temprano: hay una correlación alta negativa entre IL2 y PCR, negativa moderada entre IL6 y VSG. Para ARI tardío: correlación negativa moderada entre IL1B y DAS28PCR, positiva moderada entre IL10 y PCR; positiva moderada entre IL8 y títulos de FR y positiva alta entre TNFa y títulos de FR. En el análisis de los pacientes con tres factores de mal pronóstico se encontró: una correlación negativa moderada entre IL2 y DAS28PCR; negativa alta entre IL1B y DAS28VSG e IL1B y DAS28PCR. Positiva moderada entre IL5 y títulos de FR; positiva alta entre TNFa y PCR, positiva alta entre IL10 y TNFa con títulos de FR. **Conclusión:** La ARI temprano parece comportarse de forma diferente a la ARI tardío desde el punto de vista molecular. Parece importante continuar la caracterización de ciertas citoquinas sobre todo las de mayor positividad y correlación con otras variables tales como: IL1B, IL2, IL5, IL6, IL8, IL10 y TNFa.

Palabras Clave: artritis reumatoide de inicio temprano, artritis reumatoide de inicio tardío, citoquinas, biomarcadores.

Abstract

Background: Rheumatoid Arthritis (RA) is the most common autoimmune disease with articular involvement (1). Patients with younger onset of the disease (onset before 65 years old) behave differently than patients with elderly onset (older than 65 years old). Cytokines have become important therapeutic targets, are candidates to become diagnosis, follow up and prognosis biomarkers. **Purpose:** To characterize and compare cytokines' profiles from patients with younger-onset rheumatoid arthritis (YORA) versus patients with elderly-onset rheumatoid arthritis (EORA). To correlate those findings with DAS28ESR, DAS28CRP, ESR, CRP, CCP AB, RF. **Methods:** This is a cross-sectional study of two groups of patients with YORA and EORA from the Rheumatology Service of the National University of Colombia. We included patients older than 18 year old with RA, evaluated previous to the onset of DMARDs. We collected DAS28ESR, DAS28CRP, ESR, CRP, RF, CCP AB data. Patients with other autoimmune diseases or malignancies were excluded. We measured levels of IL1B, IL2, IL4, IL6, IL5, IL10, IL8, GM-CSF, INFg, TNFa with Human Cytokine 10-

Plex Panel, Invitrogen Rev. 2.0. We described continuous variables according to the normality result from the Shapiro Wilk's test as mean and standard deviation for normal variables and median and interquartile ranks for non-normal variables. Categorical variables were described as absolute numbers or percentages. We compared cytokine profiles between YORA and EORA groups using U Mann-Whitney. The correlation between two numerical variables was established through Pearson or Spearman's test.

Results: eighty patients were included; forty-nine in the YORA group and thirty-one in the EORA group. The values of DAS28ESR showed a statistically significant difference between the 2 groups. There were not statistically significant difference in the values of DAS28PCR, ESR, PCR, CCP AB or RF. The comparison between levels of cytokines of both groups show significant differences for all the cytokines evaluated. By correlating each cytokine and the clinical variables we did not find much significant differences. The significant differences for YORA were: a negative high correlation between IL2 and CRP and a negative moderate correlation between IL6 and ESR. For EORA a negative moderate correlation between IL1B and DAS28CRP, positive moderate between IL10 and CRP, positive moderate between IL8 and RF, and Positive high between TNFa and RF. In the worst prognosis group analysis we found a negative moderate correlation between IL2 and DAS28CRP; a negative high correlation between IL1B y DAS28ESR and IL1B and DAS28DRP; a positive moderate correlation between IL5 and RF, a positive high correlation between TNFa and CRP and a positive high correlation between IL10 and TNFa with RF.

Conclusion: YORA seems to behave differently than EORA from a molecular point of view. It seems important to continue characterizing some cytokines, particularly those that showed more positivity and correlations: IL1B, IL2, IL5, IL6, IL8, IL10 y TNFa.

Key Words: Younger-onset rheumatoid arthritis, elderly-onset rheumatoid arthritis, cytokines, biomarkers.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de tablas	XV
Introducción	1
1. Planteamiento del problema y justificación científica	3
2. Objetivos del trabajo e impacto esperado	5
2.1 Objetivo principal.....	5
2.2 Objetivos secundarios.....	5
2.3 Resultados esperados	5
2.4 Impacto esperado	6
3. Marco teórico	7
3.1 Inmunopatogénesis y papel de las citoquinas.....	7
3.2 Biomarcadores	9
3.2.1 Auto anticuerpos	10
3.2.2 Reactantes de fase aguda	10
3.2.3 Biomarcadores clínicos recientes	11
3.2.4 Biomarcadores en investigación	11
3.3 Predictores de pronóstico en AR.....	12
3.3.1 Factores modificables	12
3.3.2. Factores no modificables	13
4. Metodología	15
4.1 Diseño	15
4.2 Población.....	15
4.3 Tamaño de la muestra	15
4.4 Criterios de Inclusión.....	15
4.5 Criterios de exclusión.....	16
4.6 Variables clínicas de medición	16
4.7 Variables paraclínicas de medición	16
4.8 Descripción de los pacientes y análisis	17
4.9 Análisis estadístico.....	18
4.10 Cronograma	19
4.11 Costo y financiación	20
5. Resultados	21

6. Discusión.....	27
7. Limitaciones	34
8. Conclusiones	34
Bibliografía	35

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1: Cronograma	19
Tabla 2: Costos	20
Tabla 3: Características demográficas, clínicas y hallazgos de laboratorio de las poblaciones de AR de inicio temprano versus AR de inicio tardío.	21
Tabla 4. Razón de prevalencias.	22
Tabla 5: Porcentajes de positividad y comparación de niveles de citoquinas en AR de inicio temprano versus AR de inicio tardío.	23
Tabla 6: Coeficientes de correlación (r) y niveles de significancia (p) de la comparación de las concentraciones de citoquinas versus las variables de interés en AR de inicio Temprano.	24
Tabla 7: Coeficientes de correlación (r) y niveles de significancia (p) de la comparación de las concentraciones de citoquinas versus las variables de interés en AR de inicio Tardío.	25
Tabla 8: Correlaciones de los pacientes con tres criterios de mal pronóstico.	25

Introducción

La artritis reumatoidea (AR) es la enfermedad autoinmune con compromiso articular más frecuente en la población (1). Con un aumento en la morbilidad y mortalidad de los pacientes que la padecen y una pérdida en la calidad de vida secundaria al deterioro funcional (1).

Es la artropatía inflamatoria mejor conocida (2). En los últimos 50 años el diagnóstico y el tratamiento han tenido grandes avances y se ha modificado el curso clínico de la enfermedad (2,3).

En la actualidad existen diversos tipos de tratamientos, con diferentes blancos moleculares y con mecanismos de acción no plenamente dilucidados (3). Pero ¿Cuáles pacientes se benefician más de qué tipo de tratamiento?, es una pregunta sin clara respuesta. Mediante la observación de los grupos afectados se han logrado identificar algunos factores de mal pronóstico que sugieren un tratamiento más agresivo: el género femenino, el epítipo compartido, la presencia de auto anticuerpos, los títulos elevados de los mismos, la presencia de erosiones, y la alta actividad de la enfermedad (4). La observación clínica ha mostrado que los pacientes con un inicio temprano de la enfermedad (inicio antes de los 65 años) se comportan de una forma diferente a los pacientes con inicio tardío de la enfermedad (inicio después de los 65 años) (5), pero la o las causas de estas diferencias aún son desconocidas (4, 5).

A pesar de los avances, sigue vigente la necesidad de una mejor caracterización de los pacientes afectados, no solo desde el punto de vista genético, serológico y clínico, sino también molecular. El mayor conocimiento de la biología molecular de la enfermedad permite encontrar puntos clave en la cascada de desarrollo de la misma, susceptibles de control o bloqueo. Estos puntos suelen ser citoquinas, receptores de citoquinas o moléculas de superficie de membrana (3). Las citoquinas se han convertido en importantes blancos terapéuticos, lo cual por diferentes vías permite controlar la

inflamación y el daño articular; al igual que son candidatas para el seguimiento y clasificación (3). Se elevan en pacientes con presencia de genes asociados a autoinmunidad de forma previa al inicio de los síntomas, varían con el desarrollo de la enfermedad, y con los diferentes grados de actividad. Según su patrón pueden relacionarse con otras variables genéticas, serológicas y clínicas (5,6,7,8,9).

En este sentido, se ha demostrado la elevación de citoquinas en pacientes con AR comparados contra controles sanos antes, durante y después del inicio de la enfermedad, y esta elevación parece ser distinta en AR de inicio tardío versus AR de inicio temprano (5,6,7,8). Los estudios sugieren que existen diferentes patrones de citoquinas sinoviales y plasmáticas que se relacionan con la actividad de la enfermedad, la elevación de reactantes de fase aguda, la presencia de auto anticuerpos, la presencia de erosiones y la posible respuesta a diferentes tratamientos (5,6,7,8).

1. Planteamiento del problema y justificación científica

La heterogeneidad en las manifestaciones de la AR podrían estar asociadas con la respuesta heterogénea de citoquinas y esto podría explicar por qué todos los pacientes no responden a los mismos tratamientos (12). Los estudios de evaluación de niveles de citoquinas en pacientes con artritis indiferenciada, artritis reumatoide temprana, y artritis establecida, han demostrado la elevación de las citoquinas en los pacientes versus los controles sanos tanto en plasma como en tejido sinovial (5,6,7,8,9).

Se ha evidenciado la relevancia de la caracterización molecular de los pacientes con AR al inicio del tratamiento para establecer su severidad, posible pronóstico y propuesta de tratamiento (3). Los perfiles de citoquinas se podrían comportar como marcadores biológicos de enfermedad, actividad, severidad, pronóstico y como blancos terapéuticos.

La discusión sobre si la AR de inicio tardío es una entidad diferente a la AR de inicio temprano aún no tiene conclusión. No está claro cuál es el efecto de la edad, los cambios hormonales o la inmunosenescencia (5).

Es por esto que es de utilidad conocer los perfiles de citoquinas presentes en los pacientes colombianos, que permitan evidenciar si los hallazgos son similares con otras poblaciones, si los niveles de citoquinas se correlacionan con otros marcadores de severidad, actividad o pronóstico y si los perfiles de citoquinas muestran diferencias entre los grupos de AR de inicio temprano (ARI temprano) y AR de inicio tardío (ARI tardío).

2. Objetivos del trabajo e impacto esperado

2.1 Objetivo principal

Caracterizar y comparar los perfiles de citoquinas entre los pacientes con ARI temprano y ARI tardío.

2.2 Objetivos secundarios

- Determinar si existe correlación entre los perfiles de citoquinas y la actividad de la enfermedad medida con puntajes compuestos de actividad: Disease Activity Score 28 (DAS28) por Velocidad de sedimentación globular (VSG) y por proteína C reactiva (PCR).
- Establecer si existe correlación entre los perfiles de citoquinas y la positividad de auto anticuerpos: anticuerpos anti citrulinas (Anti CCP) y factor reumatoide cuantitativo (FR).
- Establecer si existe correlación entre los perfiles de citoquinas y la elevación de reactantes de fase aguda: VSG y PCR.
- Identificar si los perfiles de citoquinas de los pacientes con tres criterios de mal pronóstico (títulos altos de auto-anticuerpos, género femenino y alta actividad de la enfermedad medida por DAS28PCR o VSG) se correlacionan con el DAS28VSG, DAS28PCR, PCR, VSG, títulos de Anti CCP o títulos de FR.

2.3 Resultados esperados

- Determinar los perfiles de citoquinas de los grupos de ARI temprano y ARI tardío.

- Determinar si existen o no diferencias entre los perfiles de citoquinas de los grupos de ARI temprano y ARI tardío.
- Determinar si hay correlación entre los perfiles de citoquinas de los pacientes con ARI temprano, ARI tardío y pacientes de mal pronóstico, con las variables clínicas y serológicas de interés.

2.4 Impacto esperado

Con el presente estudio se busca aumentar el poder de la evidencia clínica disponible sobre la utilidad de los perfiles de citoquinas como marcadores biológicos en la artritis reumatoidea. Conocer la caracterización molecular de los pacientes colombianos estudiados. Buscar la asociación entre los perfiles de citoquinas y la actividad de la enfermedad y factores pronósticos.

Profundizar en el conocimiento de los pacientes con artritis reumatoide de los grupos mencionados, con el fin de mejorar el abordaje de los pacientes desde la unidad de reumatología de la Universidad Nacional de Colombia. Aumentar la experiencia investigativa de la unidad y de estudiantes de postgrado y pregrado asociados a la misma. Fomentar la interacción entre la investigación de las áreas básicas y clínicas. Realizar publicaciones o exposiciones nacionales e internacionales que permitan migrar en alguna medida la línea del conocimiento sobre el tema en mención.

Encontrar información sobre nuevos y mejores marcadores biológicos de: diagnóstico pre clínico en pacientes en riesgo, diagnóstico clínico, actividad, severidad y pronóstico.

3. Marco teórico

La AR es una enfermedad crónica de etiología autoinmune que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial, produce destrucción articular, deformidad y compromiso sistémico secundario a la inflamación (1,2,4). Actualmente se utilizan los criterios clasificatorios de los grupos ACR/EULAR 2010 para definir los pacientes afectados por la enfermedad (10). Los casos de "AR definida" se basan en la presencia confirmada de sinovitis en al menos 1 articulación, no explicada por otra enfermedad, asociada a un valor de 6 o más en un puntaje compuesto. Dicho puntaje está constituido por 4 dominios que toman en cuenta: el número y ubicación de articulaciones inflamadas, el valor de reactantes de fase aguda, las anomalías serológicas (auto anticuerpos) y duración de los síntomas (10).

Los auto anticuerpos relacionados con la enfermedad son los anticuerpos anti citrulinas (Anti CCP) y el factor reumatoide (FR), estos auto anticuerpos no solo son determinantes para el diagnóstico sino que adicionalmente están involucrados en la fisiopatología, al igual que los reactantes de fase aguda velocidad de sedimentación globular (VSG) y proteína C reactiva (PCR) (11).

Durante el desarrollo de la enfermedad el diagnóstico debe ser temprano ya que esto puede determinar una mejor respuesta al tratamiento, incluso antes de completar los criterios clasificatorios o el inicio de los síntomas (11).

3.1 Inmunopatogénesis y papel de las citoquinas

La AR se caracteriza porque en etapas tempranas de la enfermedad hay niveles sinoviales altos de citoquinas pro inflamatorias responsables de la proliferación sinovial, hiperplasia y angiogénesis (6,7). En la inmunopatogénesis inicial hay activación tisular de macrófagos, linfocitos y neutrófilos, que aumentan su producción de citoquinas, lo

cual perpetúa la inflamación y la formación de pannus, con posterior daño del hueso y el cartílago articular (3,6,7). Al parecer la causa inicial de la inflamación sinovial se da por la presentación de antígenos similares a los propios, por mimetismo molecular, después de una agresión externa que modifica las proteínas normales o asociado a infecciones (12).

Estos antígenos son presentados por las células presentadoras de antígeno a los linfocitos T a través del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (CMH II). Las moléculas del CMH están codificadas en el cromosoma 6. Estos genes presentan un alto grado de polimorfismos; algunos de estos polimorfismos se han asociado directamente con el desarrollo de AR como el DR4, que comparte un epítotope en la tercera región hipervariable de la cadena beta (epítotope compartido) (9,12).

La presentación de antígenos a través del CMH clase II activa a las células T CD4.

Las células T CD4 activadas producen citoquinas para activar el sistema inmune adaptativo y limpiar el desencadenante de la activación (12). Los patrones de citoquinas secretadas dependen de la diferenciación de linfocitos T a patrones T ayudadores (helper) Th1, Th2, Th9 y Th17 (12). La producción de IFN γ por las células Th1 potencia la respuesta celular y la diferenciación de células T CD4 a Th1. Sin embargo la red de patrones T ayudadores es cada vez más compleja, y la red de citoquinas secretadas por estos también. En la actualidad se reportan citoquinas asociadas al patrón Th17 tales como IL32, IL33 e IL35 (13).

Las citoquinas son las primeras sospechosas del daño articular y la utilidad de los inhibidores de citoquinas para prevenir la aparición de erosiones lo demuestra (13,3). Las articulaciones tienen macrófagos residentes que secretan citoquinas del sistema inmune innato y adaptativo. El reclutamiento de linfocitos T y B dentro de la articulación requiere la secreción de citoquinas pro inflamatorias por parte de las células presentadoras de antígeno y las células del endotelio sinovial.

Las articulaciones con compromiso por AR tienden a tener predilección por la producción de interferón gamma (IFN γ) (14); el IFN γ potencia la producción de otras

citoquinas locales como IL1, IL6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNFa) (12). La IL6 es una citoquina pro inflamatoria potente que regula la hematopoyesis y la proliferación de linfocitos. Se ha sugerido que la AR es una enfermedad dependiente de IL17; la IL23, una IL miembro de la familia de IL12, puede causar la diferenciación de células vírgenes a células productoras de IL17. La IL17 también es una citoquina proinflamatoria que actúa sobre varias células e induce la diferenciación de los osteoclastos por la vía RANKL (15). La IL5 y la IL10 podrían prevenir la apoptosis de linfocitos T y B, al igual que su función, perpetuando así la inflamación (14, 16). Posteriormente por falta de control de la respuesta inicial, se produce daño articular, deformidad y pérdida funcional.

3.2 Biomarcadores

También son denominados como marcadores biológicos, se refieren a una característica medible que puede ser usada con un indicador de algún estado o condición biológica. Este término se refiere también a la presencia de sustancias que indican la existencia de un organismo vivo (11).

Los biomarcadores cumplen un papel importante en el diagnóstico e intervención de enfermedades en estadios tempranos. También pueden ayudar a reconocer la respuesta a tratamientos. La exploración de estos indicadores no solo puede mejorar el diagnóstico sino también pueden comportarse como indicadores de pronóstico y como marcadores de respuesta a intervenciones. Un buen biomarcador es capaz de medir el progreso de la enfermedad y la efectividad del tratamiento.

Estos parámetros pueden ser químicos físicos o biológicos.

Los biomarcadores usados actualmente para el diagnóstico de AR son principalmente clínicos. En el momento hay diferentes biomarcadores útiles como los auto anticuerpos: FR, anti-factor perinuclear, anticuerpos anti keratina, anticuerpos anti filagrina y anti CCP. La PCR y la VSG también están asociadas a la enfermedad.

3.2.1 Auto anticuerpos

El FR es un anticuerpo contra la fracción FC de la IgG, es una característica clásica de la enfermedad con una sensibilidad 60-80% (17), pero tienen una baja especificidad y también puede ser detectado en otras enfermedades autoinmunes como en lupus eritematoso sistémico y síndrome de Sjögren. Los marcadores patogénicos clave son los FR Inmunoglobulina (Ig) M, e IgA (18).

Los autoanticuerpos inducidos por citrulinización, que se refiere a la conversión de la peptidil-arginina a peptidil-citrulina, pueden ser medidos eficientemente usando péptidos cíclicos citrulinados (CCP) como antígenos (19, 20). La detección de anticuerpos Anti CCP como de FR, particularmente el anticuerpo IgA, tiene alto valor predictivo positivo para el diagnóstico de AR (20, 21). Los Anti CCP son importantes predictores de pérdida mineral ósea temprana (22).

Similar al FR, los anticuerpos contra proteínas citrulinadas (ACPA) tienen correlación con la destrucción ósea, lo cual se asocia a erosiones de mayor tamaño al inducir directamente la diferenciación de osteoclastos; esta pérdida ósea inicia antes del inicio de la enfermedad en los pacientes con títulos positivos de ACPA. Por lo anterior este biomarcador fue incluido en los criterios diagnósticos ACR/EULAR (10).

3.2.2 Reactantes de fase aguda

En el manejo clínico de la enfermedad, la PCR y la VSG son pruebas comunes para guiar el diagnóstico independientemente de la medición de auto anticuerpos. La Proteína C reactiva es una proteína que se eleva en respuesta a la inflamación. Niveles elevados de PCR son detectados previos al inicio de AR (23) y también indican la actividad de la enfermedad en el curso de la misma.

La velocidad de sedimentación globular (VSG) es una medida inespecífica de la inflamación y puede ser útil no solo en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes sino en la monitorización del proceso. Puede ser un indicador que refleja la actividad y severidad de la sinovitis en AR. La combinación de VSG y PCR puede mejorar la sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de AR (24,25).

3.2.3 Biomarcadores clínicos recientes

Los niveles de calreticulina (CRT) están elevados y se detectan en pacientes con AR comparados con los controles y tienen una correlación significativa con la actividad de la enfermedad, por lo cual pueden ser un potencial biomarcador clínico (26).

Existe un sistema de anticuerpos que discrimina entre los antígenos que contienen citrulina o homocitrulina. Los anticuerpos anti proteína carbamylada (anti-CarP) IgG e IgA se encontraron en sueros de pacientes con AR (27). Estos anticuerpos también están presentes en aproximadamente el 20% de los pacientes negativos para ACPA, y se han asociado con una presentación más agresiva en cuanto al daño articular (27,28).

3.2.4 Biomarcadores en investigación

Adicionalmente a los biomarcadores clínicos usados, se han venido investigando marcadores biológicos potenciales. Las citoquinas sirven como mensajeros moleculares entre las células y hay diversos estudios que muestran que múltiples citoquinas se involucran en la patogénesis de la AR desencadenando y regulando la respuesta inflamatoria (29,30). La sobre expresión de ciertas citoquinas como IL1, IL6, IL8, IL17, IL21, TNFa, GM-CSF, se han observado en pacientes con AR. Estas citoquinas pueden promover la inflamación de la membrana sinovial y la resorción del osteocartilago a través de la estimulación de mediadores osteoclasticos.(31-36).

La IL1 es producida por una variedad de células que son parte del sistema innato y median la resorción ósea y la destrucción del cartilago. El eje IL1B- NFKB (factor nuclear Kappa Beta) es central en la producción de mediadores proinflamatorios en el tejido sinovial inflamado. La activación de NFKB por la IL1B induce la expresión de genes de metaloproteinasas de matriz que son componentes que degradan el colágeno del cartilago y hueso, lo que produce deformidad y dolor (11).

La IL6 tienen un efecto primordial en la diferenciación y activación de células B y T, macrófagos, osteoclastos, condrocitos y células endoteliales, al igual que efectos en la hematopoyesis (36). Los niveles de IL6 se han asociado significativamente con síntomas clínicos y niveles de biomarcadores clínicos (11).

El TNF α ha mostrado su papel en la patogénesis de la enfermedad en etapas tempranas, es producido localmente por los macrófagos sinoviales y los linfocitos que infiltran el tejido sinovial; se ha reconocido como la citoquina clave que dirige una de las vías de daño tisular (11)

3.3 Predictores de pronóstico en AR

Los factores predictores de pronóstico pueden ser no relacionados directamente con la enfermedad y propios de la enfermedad. Los factores externos a la enfermedad que influyen el pronóstico incluyen la edad, el género, los factores psicosociales, la genética, los estilos de vida y el tabaquismo. Y los factores específicos de la enfermedad como la positividad de auto anticuerpos. También se pueden dividir en factores modificables y no modificables (4).

3.3.1 Factores modificables

Indicadores de actividad de la enfermedad: marcadores séricos de actividad de la enfermedad como VSG y PCR; los indicadores clínicos como conteos de articulaciones dolorosas e inflamadas y los índices compuestos de actividad que son predictores de pobre pronóstico como el DAS28 (37).

La respuesta al tratamiento es un importante predictor de la evolución de la enfermedad, en los pacientes que fallan al tratamiento con metotrexate en monoterapia o en combinación, la respuesta a los siguientes tratamientos será un importante predictor de desenlaces de la enfermedad.

El tabaquismo es un factor de riesgo conocido para AR, particularmente en la AR con anticuerpos positivos, los fumadores con AR tienen peor pronóstico en términos de títulos de FR, discapacidad física, daño radiológico, y respuesta al tratamiento. Es conocida la interacción entre el tabaquismo, el CMH DR1 con epítipo compartido y la producción de ACPA y entre el tabaquismo, los ACPA, el CMH con epítipo compartido y la muerte prematura por enfermedad cardiovascular. (4)

3.3.2. Factores no modificables

La edad y el género: la mayor edad al inicio de los síntomas se asocia con peor pronóstico. El género femenino se ha asociado con una pobre respuesta al tratamiento mientras que el género masculino se ha asociado a una probabilidad más alta de remisión (38).

Positividad para autoanticuerpos: los pacientes con anticuerpos negativos parecen responder adecuadamente a la terapia con fármacos modificadores de la enfermedad (FARMES) en monoterapia, mientras que los pacientes con ACPA positivos suelen necesitar terapia combinada (39). Igualmente el FR se ha reportado como predictor de pobre respuesta (40).

La presencia de erosiones evidentes en la radiografía al momento de la primera evaluación es un marcador estable de pobre pronóstico (4).

4. Metodología

4.1 Diseño

Estudio de corte transversal.

4.2 Población

Se estudiaron dos grupos de pacientes colombianos con ARI temprano (edad de inicio menor a 65 años) y ARI tardío (edad de inicio mayor a 65 años).

4.3 Tamaño de la muestra

Todos los pacientes de la seroteca del servicio de reumatología de la Universidad Nacional de Colombia, con muestras almacenadas a - 40° en el laboratorio de Biología Molecular, que cumplieran los criterios de inclusión y exclusión.

4.4 Criterios de Inclusión

Pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de artritis reumatoide según criterios ACR 1987 (41) antes del 2010 y según criterios EULAR- ACR después del 2010 (10), clasificados como ARI temprano (edad de inicio menor de 65 años) o ARI tardío (edad de inicio mayor de 65 años). Que hayan sido evaluados clínica y serológicamente previo al inicio de fármacos modificadores de la enfermedad (FARMEs) sintéticos o biológicos. Con cuantificación de: puntajes compuestos de actividad de la enfermedad DAS28PCR o DAS28VSG, PCR, VSG, factor reumatoide cuantitativo y anticuerpos anti citrulinas.

Adicionalmente los pacientes fueron clasificados según la duración de su enfermedad, en los siguientes sub grupos:

- AR muy temprana (duración de los síntomas menor a seis meses)
- **AR temprana (duración de los síntomas menor a dos años)**

- **AR establecida (duración de los síntomas mayor a dos años)**

4.5 Criterios de exclusión

- **Presencia de otra enfermedad autoinmune articular**
- **Presencia de enfermedad auto-inflamatoria o de neoplasia**

4.6 Variables clínicas de medición

Género, edad de inicio de la enfermedad, duración de la enfermedad, DAS28 calculado por PCR y por VSG.

El DAS28 (*Disease activity score*) es una escala compuesta de actividad que tiene en cuenta cuatro factores. Es la más usada para evaluar la actividad de la AR en la clínica y en trabajos de investigación. Es un instrumento práctico, fácil de aplicar y estandarizado, es una medida de rango continuo, de tipo lineal y no requiere una medida previa. Hasta el momento esta escala no ha sido validada en Colombia pero se encuentra recomendada para evaluar el grado de actividad de la enfermedad por la *American College of rheumatology (ACR)*, la *European League Against Rheumatism (EULAR)* y la Asociación Colombiana de Reumatología (42). Se determina a partir de una ecuación que tienen en cuenta 4 factores de manera asimétrica: 1. El conteo de articulaciones dolorosas de 28 posibles: las diez interfalángicas proximales de manos, las diez metacarpofalángicas, las dos muñecas, ambos codos, hombros y rodillas; 2. El conteo de articulaciones inflamadas en las mismas 28 articulaciones señaladas; 3. La calificación por el paciente de la actividad de la enfermedad en una escala del 0 al 100 y 4. Los valores de reactantes de fase aguda VSG en mm/hr o PCR en mg/L. A través de una ecuación específica si se usa VSG o PCR, se establece un puntaje que gradúa la actividad así: muy alta actividad > 5,1; actividad moderada < 5,1 y > 3,2; baja actividad 3,2 o < y remisión 2,6 o < (42).

4.7 Variables paraclínicas de medición

La VSG se determinó por el método de Westergren en mm/hr; los niveles de PCR se determinaron por métodos de nefelometría o turbidimetría en mg/L. La positividad y títulos de factor reumatoide cuantitativo (FR) se determinaron por turbidimetría o

nefelometría en UI/mL; los anticuerpos anti citrulinas cuantitativos (Anti CCP) se determinaron por técnica de ELISA en UI/mL.

Los niveles de citoquinas se midieron de forma simultánea en placas con perlas de 5,6 micras de poliestireno que internamente se encuentran teñidas con fluoróforos rojos e infrarrojos de diferentes intensidades. A cada perla se le da una ubicación específica en la placa que permite la diferenciación de cada una de las perlas (2 perlas para cada paciente, puesto que cada suero se corrió por duplicado). Las perlas con propiedades espectrales definidas son conjugadas con anticuerpos que capturan proteínas específicas, y se adicionan junto con las muestras (que incluyen proteínas con concentraciones conocidas para la calibración, las muestras control y las muestras a estudio) en pozos donde las proteínas se unen a los anticuerpos de captura por 2 horas. Posteriormente se lava, y se adicionan anticuerpos biotinilados específicos para la detección de proteínas y se incuba por 1 hora adicional. Durante esta incubación los anticuerpos se unen a las proteínas apropiadamente inmovilizadas; después se remueve el exceso de estos últimos anticuerpos y se adiciona estreptavidina conjugada con una proteína fluorescente llamada R-ficoeritrina (RPE), se permite su incubación por 30 minutos más. La estreptavidina-RPE se une a los anticuerpos biotinilados asociados a los complejos inmunes en las perlas, formando un sándwich en fase sólida de 4 partes. Después de remover por lavado la estreptavidina-RPE no unida, se analizan las perlas con el sistema de detección Luminex. Monitorizando las propiedades espectrales de las perlas y la cantidad de fluorescencia asociada a la R-ficoeritrina, se determina la concentración de: IL- 1 beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, CXCL8 (IL-8), IL-10, factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), interferon-g (IFNg), y factor de necrosis tumoral alfa (TNFa) en pg/mL (Human Cytokine 10-Plex Panel, Invitrogen Rev. 2.0, Canada).

4.8 Descripción de los pacientes y análisis

Se tomaron los sueros de pacientes del servicio de reumatología con ARI temprano y ARI tardío que cumplieran los criterios de inclusión y no tenían criterios de exclusión. Estos sueros venían siendo recolectados para protocolos previos del servicio desde el 2005 hasta el 2013. Los pacientes suministraron su consentimiento en el momento de la toma de muestras; este consentimiento considero la toma, almacenamiento y estudio de muestras en proyectos de investigación del servicio de reumatología de la Universidad

Nacional, que tuvieran el propósito de profundizar en el conocimiento de la enfermedad por la cual estaban afectados. Por lo tanto como tal este estudio no diligencio ningún consentimiento informado adicional. La categoría de riesgo para el presente estudio se consideró mínimo: examen físico de diagnóstico, extracción de sangre por punción venosa única de aproximadamente 20 cc de sangre.

En total treinta y cinco pacientes de ARI temprano y setenta y un pacientes de ARI tardío cumplían criterios de inclusión según las bases de datos. Solo treinta y un pacientes en el grupo de ARI temprano (veinticinco mujeres y seis hombres) y cuarenta y nueve pacientes en el grupo de ARI tardío (veintinueve mujeres y veinte hombres) tenían suficiente cantidad de suero almacenado (sueros utilizados para estudios previos).

Se extrajo la información de interés de las bases de datos del servicio sin el uso de un formato de extracción particular. Los datos recopilados de los pacientes incluidos fueron: edad, género, edad de inicio de síntomas, tiempo de duración de la enfermedad, datos de DAS28 por VSG y PCR, VSG, PCR, FR y Anti CCP. A partir de esta información se construyó una nueva base de datos para el análisis estadístico.

La información de las bases de datos iniciales fué recopilada de las historias clínicas por los reumatólogos y residentes del servicio durante las consultas iniciales de pacientes referidos para evaluación reumatológica.

En los sueros disponibles de los pacientes incluidos se procedió a realizar el ensayo de detreminación de citoquinas.

4.9 Análisis estadístico

La descripción de las variables continuas se realizó según el resultado del test de normalidad de Shapiro Wilk como media y desviación estándar o mediana y rango intercuartil para variables normales y no- normales respectivamente. Las variables categóricas fueron descritas como números absolutos y porcentajes.

Se compararon los perfiles de citoquinas entre los grupos de ARI temprano y ARI tardío utilizando el t de student para muestras independientes si tenían distribución normal o U Mann-Withney si tenían distribución no-normal.

Se estableció la correlación entre dos variables numéricas mediante el test de Pearson o Spearman.

Con los niveles de citoquinas se estableció el porcentaje de pacientes con niveles detectables en suero para cada citoquina en cada población, en el grupo con positividad para cada citoquina se estableció la mediana de las concentraciones. Se compararon las medianas de las concentraciones entre la población de ARI temprano versus la población de ARI tardío. En cada grupo se evaluó la correlación de cada citoquina con el DAS28VSG, DAS28PCR, VSG, PCR, títulos de Anti CCP y títulos de FR.

Se estableció un subgrupo de mal pronóstico conformado por los pacientes de género femenino, con alta actividad de la enfermedad y títulos altos de auto anticuerpos (mas de tres veces el valor de referencia). En este grupo se estableció la correlación de las citoquinas con las variables de interés: DAS28VSG, DAS28PCR, VSG, PCR, títulos de Anti CCP y títulos de FR.

4.10 Cronograma

Tabla 1. Cronograma de actividades.

ACTIVIDAD	MARCO DE TIEMPO
Revisión de la literatura, problema y pregunta de investigación	4 meses
Diseño y presentación de protocolo de investigación y recolección de fondos	5 meses
Recolección de pacientes y datos, Análisis de laboratorio	4 meses
Análisis Estadístico	2 meses
Documento Final	2 meses

4.11 Costo y financiación

Se presentó el protocolo a las convocatorias de la Asociación Colombiana de Reumatología y convocatoria Hermes de la Universidad Nacional de Colombia para estudiantes de postgrado, se ganó el apoyo de la Asociación Colombiana de Reumatología por valor de 12.000.000

Tabla 2. Costos.

ACTIVIDAD	CANTIDAD	COSTO EN PESOS
Kit para cuantificación de citoquinas	2	12.000.000
Honorarios bacterióloga y análisis de laboratorio	48 horas	2.000.000
Honorarios de especialista epidemiología y estadística médica	10 horas	600.000
Fotocopias de consentimiento informado, remisión de muestras y papelería	1000 copias 1000 hojas	100.000
Transporte de muestras al laboratorio	Garantía de cadena de frío, transporte urbano	200.000
Insumos de laboratorio (Tubos, Aguja, Venojets)	200 tubos de ensayo, 200 venojets	400.000
	TOTAL	\$15.300.000

5. Resultados

En total ochenta pacientes fueron incluidos en el estudio, cuarenta y nueve pacientes de ARI tardío, y treinta y un pacientes de ARI temprano; las características demográficas, clínicas y hallazgos de laboratorio se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Características demográficas, clínicas y hallazgos de laboratorio de las poblaciones de AR de inicio temprano versus AR de inicio tardío.

	ARI Temprano	ARI Tardío	p
Edad de inicio	43,7 (14,3)	70,1 (4,1)	
Género femenino	80,60%	59,10%	
DAS28VSG	6,7 (4,8-7,2)	5,43 (1,66-6,5)	0,07
DAS28PCR	5,8 (0,0-6,8)	5,72 (4,5-6,4)	0,92
VSG	24 (13-28)	20 (6-27)	0,32
PCR	0,8 (0,4-1,2)	1,2 (0,25-1,8)	0,108
AntiCCP valor	69,5 (15,1-165,2)	122 (8,5-172,7)	0,55
AntiCCP porcentaje	51,60%	61,20%	
AntiCCP títulos Altos	54,80%	59,10%	
FR	40 (10-75)	23 (9-45,5)	0,97
FR porcentaje	51,60%	48,90%	
FR títulos Altos	41,90%	44,80%	
Duración de la enfermedad			
< 6 meses	12,9%	22,4%	
< 2 años	54,8%	40,8%	
> 2 años	32,2%	36,7%	
Alta Actividad	64,5%	69,3%	

Se observa como las edades de inicio son más homogéneas en el grupo de AR de inicio tardío; el porcentaje de la población femenina es mayor en el grupo de AR de inicio temprano. La mediana de la actividad de la enfermedad en ambos grupos se encontraba

clasificada como alta actividad de la enfermedad (alta actividad= valor del DAS28 mayor a 5,1); pero para los valores de DAS28VSG existe una diferencia estadísticamente significativa, aunque los dos valores como tal se encuentran en la clasificación de alta actividad. Sin embargo los rangos entre los dos grupos se sobreponen, siendo más amplio en el grupo de ARI tardío y va desde remisión hasta alta actividad mientras que en el grupo de ARI temprano los rangos son más estrechos y se encuentran los valores entre actividad moderada y alta actividad. Esta diferencia se presenta a pesar de que el valor como tal de VSG no muestra diferencias significativas entre los dos grupos.

No se encontraron diferencias significativas para DAS28PCR, PCR, títulos de Anti CCP ni títulos de FR. Los porcentajes de títulos altos de FR y AntiCCP y porcentajes de positividad de FR y AntiCCP fueron similares en los dos grupos. Aproximadamente dos tercios de los pacientes en ambos grupos tenían una artritis reumatoide no establecida, es decir, que la mayoría de los pacientes en ambos grupos tenían una evolución menor a 2 años.

Al realizar el análisis de la razón de prevalencias (RP) no encontramos hallazgos estadísticamente significativos (Tabla 4.). No se hizo corrección para el nivel de significancia en relación con la múltiples comparaciones dado que ninguna de las RP fue significativa.

Tabla 4. Razón de prevalencias.

Característica	RP	IC95%
Género Femenino	0,73	0,54-1,09
Positividad AntiCCP	1,18	0,78-1,78
Títulos altos AntiCCP	1,07	0,72-1,60
Positividad FR	0,94	0,60-1,48
Títulos altos FR	1,06	0,63-1,79
Alta actividad	1,07	0,78-1,48
Duración de 36 meses	1,73	0,60-4,98

En la comparación entre las concentraciones de citoquinas de los dos grupos, todas las citoquinas muestran una diferencia significativa (Tabla 5). Adicionalmente se observa que los porcentajes de positividad para cada citoquina son muy distintos en cada grupo.

Tabla 5. Porcentajes de positividad y comparación de niveles de citoquinas en AR de inicio temprano versus AR de inicio tardío.

Citoquinas	Porcentaje de positividad	Pg/mL	P
IL-8			0,018
ARI Tem	29	22,0 (10-32)	
ARI Tardío	38.7	41,0 (14,5-66)	
IL-6			0,015
ARI Tem	58	25,0 (3-53,2)	
ARI Tardío	36.7	32,0 (16- 108,5)	
IL-5			0,005
ARI Tem	29	32,0 (11-102,5)	
ARI Tardío	36.7	20,5 (15-30)	
IL-4			< 0.0001
ARI Tem	32,2	28,6 (11,8-36,2)	
ARI Tardío	30.6	12,0 (8,5-23)	
IL-2			0,0384
ARI Tem	38,7	32,5 (10,2-65,7)	
ARI Tardío	40.8	62,5 (40,9-90)	
IL-10			0,0225
ARI Tem	25,8	22,0 (18,5-28,2)	
ARI Tardío	36,7	41,5 (21,2 - 69,5)	
IL-1B			0,0187
ARI Tem	29	47,0 (26,5-180)	
ARI Tardío	48,9	47,5 (22,2-209,2)	
INF Gamma			0,0022
ARI Tem	16,1	52,0 (33-102)	
ARI Tardío	32,6	42,5 (29,2-56,7)	
GM-CSF			0,0054
ARI Tem	22,5	17,0 (13,5 - 35)	
ARI Tardío	30,6	30,0 (13,6-66)	
TNFa			0,0069
ARI Tem	25,8	26,0 (10,7-32)	
ARI Tardío	32,6	42,5 (18,5-109,6)	

Al realizar la correlación entre cada citoquina y las variables de interés (Tablas 6 y 7) se encuentran pocas correlaciones significativas. Para el grupo de AR de inicio temprano se

observa una correlación alta inversamente proporcional entre la IL 2 y los valores de PCR y una correlación igualmente negativa pero moderada entre la IL6 y los valores de VSG. Para el grupo de AR de inicio tardío se muestra una correlación inversamente proporcional moderada entre la IL1B y el DAS28PCR, una correlación positiva moderada entre IL10 y PCR e IL8 y títulos de FR; y una correlación positiva alta entre TNFa y títulos de FR.

Tabla 6. Coeficientes de correlación (r) y niveles de significancia (p) de la comparación de las concentraciones de citoquinas versus las variables de interés en AR de inicio Temprano.

		IL8	IL6	IL5	IL4	IL2	IL10	IL1B	IFN-g	GM-CSF	TNFa
DAS28VSG	r	-0,37608	0,019843	0,442589	-0,17793	-0,42329	-0,01198	-0,03405	0,7	0,566139	-0,54325
	p	0,3125	0,937708	0,229817	0,632142	0,170347	0,977547	0,93071	0,18812	0,185199	0,164067
DAS28PCR	r	-0,17095	0,106312	0,442589	0,118808	-0,16552	-0,02395	-0,2308	0,6	0,377426	-0,17095
	p	0,64364	0,717557	0,229817	0,733007	0,633662	0,976786	0,551709	0,35	0,395635	0,64364
PCR	r	0,237288	-0,51217	0,063292	0,116937	-0,70481	-0,3012	-0,24268	-0,6	0,412861	0,237288
	p	0,551709	0,061151	0,880093	0,758931	0,015435	0,46847	0,529241	0,284757	0,35728	0,538712
VSG	r	0,153852	-0,59043	0,309626	-0,60791	-0,60281	-0,59036	0,12605	0,1	0,327327	0,153852
	p	0,708069	0,026219	0,410081	0,066735	0,051913	0,132292	0,743541	0,95	0,497619	0,708069
TITANTICCP	r	-0,08404	-0,18302	-0,02521	-0,01824	-0,01367	-0,32336	-0,47699	-0,3	0,145479	-0,08404
	p	0,843182	0,531128	0,948391	0,97296	0,967308	0,427877	0,1938	0,683333	0,78254	0,843182
TITFR	r	0,215192	-0,5072	0,519191	-0,01841	-0,13532	-0,10779	-0,12605	-0,1	-0,05661	0,215192
	p	0,580941	0,064141	0,1618	0,97296	0,693713	0,793006	0,743541	0,95	0,906349	0,580941

Tabla 7. Coeficientes de correlación (r) y niveles de significancia (p) de la comparación de las concentraciones de citoquinas versus las variables de interés en AR de inicio Tardío.

		IL8	IL6	IL5	IL4	IL2	IL10	IL1B	IFN-g	GM-CSF	TNFa
DAS28VSG	r	-0,02495	0,181914	0,39234	-0,04964	-0,2411	0,097757	-0,36308	0,14927	-0,33666	-0,08272
	p	0,919252	0,470019	0,10731	0,860542	0,305835	0,699572	0,081184	0,581117	0,219837	0,760706
DAS28PCR	r	-0,00877	0,132437	0,411186	-0,08684	-0,13097	0,168215	-0,54284	0,185294	-0,16726	-0,38025
	p	0,971569	0,600375	0,090035	0,758286	0,582044	0,504633	0,006126	0,492057	0,551289	0,146261
PCR	r	0,199473	-0,04865	-0,03473	0,141704	-0,34915	0,5323	-0,20445	-0,01628	0,222023	-0,21076
	p	0,41294	0,847965	0,891172	0,61443	0,131332	0,022964	0,337918	0,952269	0,426442	0,433326
VSG	r	0,067319	-0,18257	0,287637	0,141959	-0,38171	0,228616	-0,12212	0,020898	-0,16351	-0,06494
	p	0,784217	0,468384	0,247111	0,613786	0,096769	0,361521	0,569736	0,938768	0,560375	0,811139
TITANTICCP	r	0,354386	0,185109	-0,04863	0,058192	-0,20316	0,331269	0,103936	-0,25294	-0,084	-0,20619
	p	0,136573	0,462119	0,848042	0,836794	0,390302	0,179322	0,628876	0,344563	0,765974	0,443599
TITFR	r	0,544337	0,140714	0,474911	-0,32587	0,021829	0,708312	-0,18281	-0,17059	0,200358	-0,48301
	p	0,015972	0,57758	0,046417	0,235894	0,927217	0,001003	0,392551	0,52761	0,474008	0,058064

En el análisis de los pacientes con los tres factores de mal pronóstico (Tabla 8.) hay una correlación estadísticamente significativa entre una cantidad un poco mayor de citoquinas; inversamente proporcional moderada entre los valores de IL2 y el DAS28PCR; inversamente proporcional alta entre IL1B y DAS28VSG e IL1B y DAS28PCR. Una correlación positiva moderada entre IL5 y títulos de FR; positiva alta entre TNFa y el valor de PCR, positiva alta entre IL10 y TNFa con títulos de FR.

Tabla 8. Correlaciones de los pacientes con 3 Criterios de mal pronóstico.

		IL8	IL6	IL5	IL4	IL2	IL10	IL1B	IFG	GMC-CF	TNFA
DAS28VSG	r	-0,4924	-0,3022	0,433333	-0,57143	-0,46119	0,19247	-0,75	1	-0,51498	-0,35714
	p	0,077411	0,157804	0,124959	0,1	0,077288	0,306702	0,033135	0,166667	0,098314	0,222222
DAS28PCR	r	-0,30395	-0,20879	0,566667	0	-0,52055	0,45	-0,89286	0,5	-0,54762	0,198206
	p	0,193453	0,246811	0,060287	0,518254	0,050155	0,114909	0,006151	0,5	0,085491	0,330754
PCR	r	0,121581	-0,23416	0,083333	0,234244	-0,21739	0,53557	-0,46429	0,5	0,071429	0,810844
	p	0,366504	0,220647	0,421591	0,297421	0,260389	0,073763	0,151191	0,5	0,440997	0,017063
VSG	r	-0,20122	-0,34986	0,416667	-0,42857	-0,28375	0,235302	-0,32143	1	-0,57836	-0,25226
	p	0,291829	0,120629	0,134791	0,176786	0,201175	0,275854	0,24881	0,166667	0,066146	0,297421
TITANTICCP	r	0,224242	-0,17033	-0,23333	0,142857	-0,00456	0,416667	0,321429	0,5	-0,54762	0,214286
	p	0,26833	0,288988	0,275854	0,39127	0,494733	0,134791	0,24881	0,5	0,085491	0,330754
TITFR	r	0,624242	0,225275	0,6	-0,10714	0,132119	0,766667	0	1	-0,02381	0,892857
	p	0,030158	0,229653	0,048399	0,419841	0,346856	0,010695	0,518254	0,166667	0,488393	0,006151

6. Discusión

En estudios de cohorte basados en poblaciones se ha observado como el porcentaje de mujeres afectadas por AR es mayor que el porcentaje de hombres, usualmente con una relación de 3:1 (8). Dicha observación se reproduce en este estudio principalmente en la población de Artritis reumatoidea de inicio temprano. Sin embargo parece que esa proporción se disminuye en la ARI tardío; aumentando el porcentaje de hombres afectados en dicho grupo, con una distribución más equitativa y una relación cercana a 1:1; este hallazgo se ha encontrado previamente en otros estudios (43,44) y aunque no es clara su causa puede estar asociado a los cambios hormonales y a que es posible que las anomalías genéticas que llevan a la presentación de la enfermedad en edades tardías sean diferentes de las anomalías conocidas para la ARI temprano (HLA, epítoto compartido o PTPN22).

Aunque se usaron dos criterios diferentes para el diagnóstico de AR, dependiente del año en el cual fue ingresado el paciente, los criterios ACR/EULAR 2010 han demostrado clasificar los mismos pacientes que los criterios ACR 1987, solo que 5 años antes, la incidencia basal es mayor con los criterios ACR/EULAR 2010, pero 5 años después se equiparan, es decir, se diagnostican los mismos pacientes pero de forma temprana (45) por lo cual no consideramos necesario realizar un análisis estratificado considerando este factor.

La población de ARI tardío no ha sido hasta el momento ampliamente estudiada; la mayoría de estudios en AR incluyen pacientes con edades de inicio de la enfermedad inferiores a 60 años y por lo general no se hace análisis por subgrupos. En dos estudios cuyo objetivo fue describir la población de ARI tardío, se observó como estos pacientes mostraban una menor positividad de FR, sin embargo estos estudios fueron realizados antes del año 2000 y es probable que la sensibilidad y la especificidad de las pruebas se haya modificado por evolución en las técnicas de detección (43,44). En otro estudio más

reciente se mantiene esta tendencia de menor positividad de FR en la población de ARI tardío con respecto a los pacientes con ARI temprano, siendo 74,4% versus 88,2 % de positividad para ARI tardío y ARI temprano respectivamente, en ese estudio la técnica utilizada fue nefelometría en todos los pacientes (5). Sin embargo estos dos valores se encuentran dentro de los rangos usuales de positividad para el FR no discriminados por edad de inicio. En el presente trabajo no encontramos diferencias significativas con respecto a: títulos de auto anticuerpos (FR y Anti CCP), porcentajes de positividad de los mismos o presencia de títulos altos; es importante resaltar que los ensayos de detección de autoanticuerpos en nuestro trabajo no fueron realizados en los mismos laboratorios ni exactamente en el mismo tiempo de evolución de la enfermedad, y se ha observado que en cuanto se cronifica la enfermedad es más probable positivizar los autoanticuerpos. Dada la heterogeneidad en estos aspectos no es posible concluir que la detección de autoanticuerpos en ambas poblaciones sea igual, pero al menos en esta primera aproximación parecen similares.

Al igual que en otros ensayos, no hubo diferencias significativas en los valores de PCR, lo cual habla de su estabilidad para la cuantificación de la inflamación, independientemente de la edad, ya que el elemento de actividad de la enfermedad (que habla del grado de inflamación) era similar en ambos grupos y la mayoría de los pacientes en las dos poblaciones presentaban alta actividad de la enfermedad cuantificada por cualquiera de los métodos de DAS28.

Los resultados fueron más homogéneos para DAS28PCR en el grupo de ARI tardío, con un rango de clasificación entre moderada y alta, pero cuando la actividad de la enfermedad es medida con DAS28 con VSG hay diferencias significativas entre los dos grupos, aunque no hay diferencias en el valor de VSG como tal. Los rangos de DAS28VSG en ambos grupos se sobreponen, y ambos quedan clasificados en alta actividad de la enfermedad, lo cual no daría a esta diferencia mayor relevancia clínica, pero los datos para DAS28VSG en el grupo de ARI tardío son más heterogéneos y van desde remisión hasta alta actividad; mientras que en ARI temprano se encuentran más homogéneos y están entre actividad moderada y alta. Esto puede deberse a que en el cálculo del DAS28 se le da un peso logarítmico al valor de VSG, y este suele ser muy

variable en pacientes mayores de 65 años; lo cual sugeriría que la evaluación de actividad de la enfermedad por DAS28PCR es más estable en el grupo de ARI tardío.

Con respecto a los valores y patrones de positividad de las citoquinas, se evidencia claramente que los dos grupos son diferentes molecularmente a pesar de que su única diferencia clínica importante sea la edad de presentación. Este hallazgo daría soporte a la hipótesis de que la edad de presentación podría significar una diferencia en la inmunopatogénesis de las dos presentaciones, y posible y consecuentemente también una diferencia en su pronóstico y tratamiento.

Las concentraciones de citoquinas muestran una gran heterogeneidad en sus valores, no todos los pacientes tienen positividad para cada citoquina y los porcentajes de positividad son muy variables. En ARI temprano van desde 16,1% para INFg hasta 58% para IL6, siendo esta última la más frecuentemente elevada. En el grupo de ARI tardío las citoquinas menos frecuentes son GM-CSF e IL4, con un porcentaje de positividad de 30,6 % y la más frecuente es la IL1B con 48,9 %. En otros estudios se ha evidenciado como las citoquinas más elevadas en la fase preclínica y que diferencian al grupo de pacientes en fase preclínica de los controles sanos son la IL4, IL12, IFNg e IL10 (8); por lo cual y dado que los pacientes en nuestro trabajo ya se encontraban en la fase clínica y activa de la enfermedad, no sorprende que estas citoquinas no sean las más frecuentemente elevadas.

El hallazgo de la IL6 como la IL más frecuente en la población de ARI temprano, es similar al de otros estudios. La IL6 fue la segunda citoquina más frecuentemente elevada en el grupo de ARI tardío y es la justificación que se ha propuesto para los intensos síntomas constitucionales asociados a la AR en pacientes mayores (5). El bajo porcentaje de positividad para la mayoría de los pacientes, y en la mayoría de citoquinas, contrasta con los hallazgos encontrados en otros estudios que reportan que la gran mayoría de citoquinas son positivas en todos los pacientes. Sin embargo en todos los estudios realizados hasta el momento existe una gran variabilidad en las concentraciones de cada citoquina independientemente del ensayo usado para su medición y por lo general son medidas en fases preclínicas o muy iniciales de la enfermedad, incluso cuando la artritis aún es indiferenciada (5,6,8,12). Esto habla de una gran variabilidad biológica de las citoquinas, dependiente al parecer de la fase de la enfermedad, la edad de presentación, el grado de actividad y probablemente el tratamiento; factores por establecer y que

requerirán en futuros estudios un tamaño de muestra mayor, calculado con base en los porcentajes de positividad para cada citoquina de interés. Este estudio muestra los porcentajes de positividad de cada citoquina en cada uno de los grupos.

Al evaluar las correlaciones entre las citoquinas y las variables de interés encontramos pocas correlaciones estadísticamente significativas, aunque es importante recalcar que por las características de diseño del estudio y el tamaño de la muestra es difícil establecer relaciones de causalidad. Llama la atención la correlación inversamente proporcional entre la IL2 y PCR e IL6 y VSG en el grupo de ARI temprano, ya que siendo estas citoquinas de activación, no parece lógico que se relacionen negativamente con los reactantes de fase aguda, sin embargo este hallazgo se ha encontrado en otros estudios, donde el perfil de citoquinas no se relaciona directamente con los marcadores clásicos de inflamación tales como: conteos articulares o reactantes de fase aguda; al parecer las citoquinas como tal, según la fase de la enfermedad en la que sean medidas muestran perfiles independientes que se relacionan más con el tiempo de evolución de la enfermedad, la positividad de autoanticuerpos y la presencia o no de erosiones (6). Por lo anterior no sorprende encontrar una relación inversamente proporcional entre IL1B y DAS28PCR para la ARI tardío. Sin embargo el hecho de que la IL1B sea la IL más frecuente en el grupo de ARI tardío, si puede hablar de peor pronóstico dado que esta IL se ha encontrado en otros estudios asociada a la presencia de erosiones (8). Además es una citoquina inducida en las fases activas de la enfermedad, producida por macrófagos locales y células de órganos linfoides periféricos (8). Igualmente aunque se esperaría una alta positividad para TNFa, su expresión en sangre periférica no es tan abundante (porcentajes de positividad de 25,8% en el grupo de ARI temprano y 32,6% en ARI tardío); en los pacientes con AR clínicamente activa los niveles bajos de TNFa se han asociado con sinovitis difusa (6).

Con respecto a la correlación positiva encontrada entre IL10 y PCR e IL-8 y TNFa con títulos de FR, estos hallazgos son similares a lo reportado en estudios previos y se podrían relacionar indirectamente con pronóstico.

Al evaluar los pacientes de peor pronóstico se observa una relación negativa entre IL2 Y DAS28VSG, IL1B y DAS28VSG e IL1B y DAS28PCR, estos datos a simple vista podrían

parecer difíciles de interpretar pero tienen relación con los hallazgos de un estudio previo que mostraba tres grupos con fenotipos severos de inflamación, en donde los títulos bajos de IL2 se encontraban entre las citoquinas con relación inversamente proporcional a la severidad y donde en la AR activa la IL1B se comporta casi como un marcador independiente de actividad (6). En el presente trabajo se encontró una correlación directamente proporcional entre IL5 y FR, IL10 y FR y TNFa con FR y PCR; estos valores son acordes con los presentados en otras poblaciones y sugieren relaciones positivas entre estas citoquinas y la positividad de autoanticuerpos que es un factor establecido de mal pronóstico; sobre todo la presencia de IL4, IL5 e IL10, se ha relacionado positivamente con la activación y producción de anticuerpos por los linfocitos B (6,8).

7. Limitaciones

A final del documento es opcional incluir índices o glosarios. Éstos son listas detalladas y especializadas de los términos, nombres, autores, temas, etc., que aparecen en el trabajo. Sirven para facilitar su localización en el texto. Los índices pueden ser alfabéticos, cronológicos, numéricos, analíticos, entre otros. Luego de cada palabra, término, etc., se pone coma y el número de la página donde aparece esta información.

8. Conclusiones

La ARI temprano parece comportarse de forma diferente a la ARI tardío desde el punto de vista molecular. La mayor incidencia de la enfermedad en el género femenino se pierde con la edad. Parece que la PCR es un valor que se afecta en menor proporción por la edad y puede comportarse como una mejor herramienta para evaluar la actividad de la enfermedad en su presentación tardía. Se observa una similitud de la positividad de los autoanticuerpos, tanto Anti CCP como FR, para los dos grupos, lo cual refuerza su valor como herramienta diagnóstica y pronóstica en la AR en general.

Parece importante continuar la caracterización de ciertas citoquinas sobre todo las de mayor positividad y correlación con otras variables tales como: IL1B, IL2, IL5, IL6, IL8, IL10 y TNFa. Las citoquinas a estudio deberán depender de la fase en la cual se quiera profundizar (pre clínica, clínica o establecida). En futuros estudios es necesario comparar contra controles sanos y establecer mejor porcentajes de positividad y concentraciones, homogenizar la muestra en cuanto a tiempo de evolución, edad de presentación, comorbilidades, severidad, factores pronósticos, tratamiento y posiblemente realizar el análisis por subgrupos.

Bibliografía

1. Boonen A, Severens JL. "The burden of illness of rheumatoid arthritis". *Clinical Rheumatology*. 2011; Mar;30 Suppl 1:S3-8
2. Thompson MK, Axford JS, Sofat N. "Rheumatoid arthritis in 2011: an editorial". *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*. 2011 Aug;25(4):435–446.
3. Smolen JS, Aletaha D, Redlich K. "The pathogenesis of rheumatoid arthritis: new insights from old clinical data?" *Nature Reviews Rheumatology*. 2012;8:235–243.
4. Verstappen S., Symmons D. "¿What is the outcome of RA in 2011 and can we predict it?" *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 25 (2011) 485–496.
5. Chen D., Hsieh T., Chen Y., Hsieh Ch., Lan J., Lin F. "Proinflammatory cytokine profiles of patients with elderly-onset rheumatoid arthritis: A comparison with younger-onset disease". *Gerontology*. 2009;55:250-258.
6. Hitchon CA., Alex P., Erdile LB, Frank M., Dozmorov I., Tang Y. y col. "A distinct multicytokine profile is associated with anti-cyclical citrullinated peptide antibodies in patients with early untreated inflammatory arthritis". *Journal of Rheumatology* 2004;31:2336-46.
7. Wright HL, Bucknall RC, Moots RJ, Edwards SW. "Analysis of SF and plasma cytokines provides insights into the mechanisms of inflammatory arthritis and may predict response to therapy". *Rheumatology* 2012;51:451-459.
8. Kokkonen H, Soderstrom I, Rocklov J, Hallmans G, Lejon K, Dahlqvist SR. "Up-regulation of cytokines and chemokines predates onset of rheumatoid arthritis". *Arthritis and Rheumatism* 2010; 62:383-391.
9. Raza K., Falciani F., Curnow SJ., Ross EJ., Lee Ch., Akbar A. Y col. "Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient sinovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin". *Arthritis Research & Therapy* 2005;7:R784-R795.
10. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO III, y col. " 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of

- Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative". *Arthritis and Rheumatism* 2010;62: 2569–8.
11. Niu X. y Chen G. "Clinical Biomarkers and Pathogenic-Related Cytokines in Rheumatoid Arthritis". *Journal of Immunology Research* 2014:698192.
 12. Taneja V. "Cytokines pre-determined by genetic factors are involved in pathogenesis of Rheumatoid arthritis". *Cytokine* (2014).
 13. Astry B., Harberts E., Moudgil K.D., "A cytokine-centric view of the pathogenesis and treatment of autoimmune arthritis (review)". *Journal of interferon and cytokine research*. 2011;31:927-940.
 14. Feldmann M., Brennan FM:, Maini RN. "Role of cytokines in rheumatoid arthritis". *Annual Review of Immunology* 1996;14:397-440.
 15. Kotake S., Udagawa N., Takahashi N., Matsuzaki K., Itoh K., Ishiyama S. y col. "IL-17 in synovial Fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis". *Journal of clinical investigation*. 1999;103(9):1345-1352.
 16. Levy Y., Brouet JC. "Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center Bcells by induction of bcl-2 protein". 1994;93(1):424-428.
 17. S. Bas, T. V. Perneger, M. Seitz, J. Tiercy, P. Roux-Lombard, and P. A. Guerne, "Diagnostic tests for rheumatoid arthritis: comparison of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies, anti- keratin antibodies and IgM rheumatoid factors," *Rheumatology*, 2002.;41(7):809–814.
 18. Scott DL., Wolfe F., Huizinga TWJ. "Rheumatoid arthritis," *The Lancet*, 2010;376 (9746):1094–1108.
 19. Van Venrooij WJ y Pruijn GJM., "Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis," *Arthritis Research*, 2000; 2(4):249–251.
 20. Dahlqvist SR., de Jong BAW, Berglin "Anti- bodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis," *Arthritis and Rheumatism*, 2003;48(10):2741–2749.
 21. Visser H., Le Cessie S., Vos K., Breedveld FC., Hazes JMC. "How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis," *Arthritis and Rheumatism*, 2002;46,(2):357–365.
 22. Boyesen P., Hoff M., Odega S. "Antibodies to cyclic citrullinated protein and erythrocyte sedimentation rate predict hand bone loss in patients with rheumatoid arthritis of short duration: a longitudinal study," *Arthritis Research and Therapy*,

- 2009;11(4):103.
23. Nielen MMJ., Van Schaardenburg D., Reesink HW., "Increased levels of C-reactive protein in serum from blood donors before the onset of rheumatoid arthritis," *Arthritis and Rheumatism*, 2004;50(8):2423–2427.
 24. Shadick NA., Cook NR, Karlson EW. "C-reactive protein in the prediction of rheumatoid arthritis in women," *Archives of Internal Medicine*, 2006;166(22):2490–2494.
 25. Barnabe C., Xiong J., Pope JE "Factors associated with time to diagnosis in early rheumatoid arthritis," *Rheumatology International*, 2014;34:85–92.
 26. Ni M., Wei W, Wang Y. "Serum levels of calreticulin in correlation with disease activity in patients with rheumatoid arthritis," *Journal of Clinical Immunology*, 2013;33(5):947–953.
 27. Shi J., Knevel R., Suwannalai P. "Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011;108(42):17372–17377.
 28. Willemze A., Toes R. E. M., Huizinga T. W. J., y Trouw L. A. "New biomarkers in rheumatoid arthritis," *Netherlands Journal of Medicine*. 2012;70(9):392–399.
 29. McInnes IB y Schett G. "The pathogenesis of rheumatoid arthritis," *The New England Journal of Medicine*,2011;365(23):2205–2219.
 30. Burska A., Boissinot M, y Ponchel F. "Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis," *Mediators of Inflammation*, 2014;24 paginas.
 31. Jørgensen KT., Wiik A., Pedersen M, "Cytokines, autoantibodies and viral antibodies in premonitory and postdiagnostic sera from patients with rheumatoid arthritis: case-control study nested in a cohort of Norwegian blood donors," *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2008;67(6):860–866.
 32. Niu X., He D., Zhang X. "IL-21 regulates Th17 cells in rheumatoid arthritis," *Human Immunology*,2010;71(4):334–341.
 33. Niu X., He D., Deng S."Regulatory immune responses induced by IL-1 receptor antagonist in rheumatoid arthritis," *Molecular Immunology* 2011; 49(1-2):290–296.
 34. O' Gradaigh D., Ireland D., Bord S., y Compston JE, "Joint erosion in rheumatoid arthritis: Interactions between tumour necrosis factor α , interleukin 1, and receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) regulate osteoclasts," *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2004;63(4):354–359.

35. Maini RN y Taylor PC, "Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis," *Annual Review of Medicine*, 2000;51:207–229.
36. Chen G. "Immunotherapy of rheumatoid arthritis targeting inflammatory cytokines and autoreactive T cells," *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2010;58(1):27– 36.
37. GoronzyJJ, MattesonEL, FulbrightJW." Prognostic markers of radiographic progression in early rheumatoid arthritis". *Arthritis and Rheumatism* 2004 Jan;50(1):43–54.
38. Goetz I, Carter GC, Lucero M, "Review of treatment response in rheumatoid arthritis: assessment of heterogeneity".*Current Medical Research and Opinion* 2011 Apr;27(4):697–711.
39. Verstappen SM, Lunt M, Bunn DK. "In patients with early inflammatory polyarthritis, ACPA positivity, younger age and inefficacy of the first non-biological DMARD are predictors for receiving biological therapy: results from the Norfolk Arthritis Register" *Annals of Rheumatic Diseases* 2011 Aug;70(8):1428–32.
40. Mottonen T, Paimela L, Leirisalo-Repo M, "Only high disease activity and positive rheumatoid factor indicate poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis treated with "sawtooth" strategy". *Annals of Rheumatic Diseases* 1998 Sep;57(9):533–9.
41. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, y col. "The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis". *Arthritis and Rheumatism* 1988;31:315–24.
42. Belmonte M.A., ¿Es la puntuación DAS28 el método más adecuado para estimar la actividad de la rritis reumatoide? Consideraciones clinimétricas y escenarios de simulación. *Reumatología Clínica*. 2008;4(5):183-190.
43. Yazici Y., Paget S.; Elderly-onset rheumatoi arthritis. *Rheumatic diseases clinics of North America*. 2000; 26(3):517-26.
44. Bajocchi G., La Corte R., Locaputo A., Govoni M., Trotta F. Elderly onset rheumatoid arthritis:clinical aspects. *Clinical and experimental rheumatology*.2000 Jul-Aug;18 (4 Supple 20):S49-50.
45. Humphreys J.H., Verstappen S., Hyrich K., Chipping J., Marshall T., Symmons D. The incidence of rheumatoid arthritis in the UK: comparisons using the 2010 ACR/EULAR classification criteria and the 1987 ACR classification criteria. *Results*

from the Norfolk Arthritis Register. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013
Aug;72(8):1315-20.