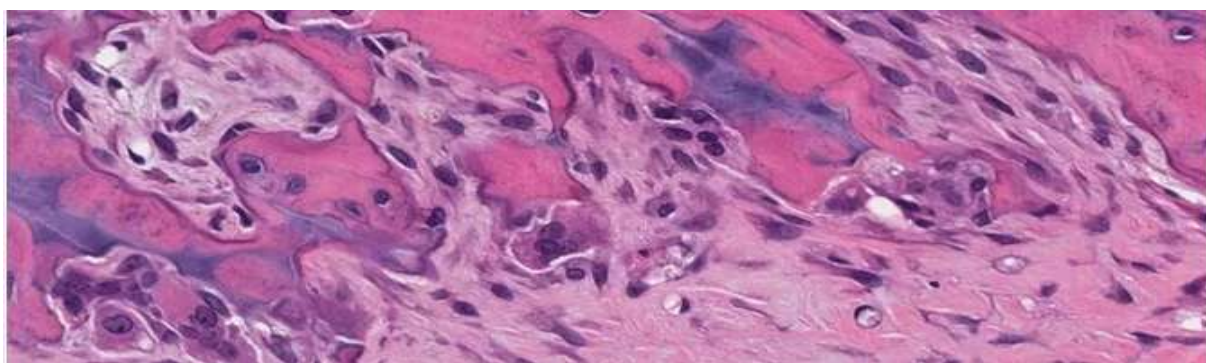




Estudio de los macrófagos en la respuesta inflamatoria de Artritis Reumatoide.



Dr. Pablo Lores - Maestría en Ciencias Biomédicas
Programa para la Investigación Biomédica **Pro.In.Bio**

Directora Académica: Prof. Agda.Dra. Teresa Freire
Tutora de la especialidad: Prof. Adj. Dra. Carolina Díaz

Laboratorio de Inmunomodulación y Vacunas - U.A de Inmunobiología
Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas - Hospital Maciel

Facultad de Medicina
Universidad de la República

Marzo 2025. Versión 2.

Resumen

Introducción: La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune caracterizada por inflamación articular severa, hiperplasia sinovial y degradación del cartílago y hueso articular. Los pacientes con AR presentan una respuesta inmunitaria amplificada de los linfocitos Th1 y Th17, así como la producción de autoanticuerpos por linfocitos B autorreactivos. En la articulación, los macrófagos median la destrucción ósea y mantienen el proceso inflamatorio en la AR. Existe un creciente conjunto de evidencias que indica que las especies reactivas de oxígeno (ROS) derivadas de la NADPH oxidasa (NOX2), producidas principalmente por macrófagos y neutrófilos, pueden tener funciones efectoras en la AR.

Hipótesis: La AR induce un estado inflamatorio sistémico, caracterizado por un aumento de monocitos circulantes y macrófagos tisulares de fenotipo proinflamatorio productores de ROS vinculado a un agravamiento de la actividad de la enfermedad.

Objetivos: Este estudio tuvo como objetivo general analizar la respuesta inflamatoria monocito-macrofágica en la AR a nivel sistémico y articular. Específicamente, describir la respuesta inmune inflamatoria de esta enfermedad, caracterizar las poblaciones monocitarias y macrofágicas, investigar el papel de las ROS en la inflamación, y correlacionar variables inflamatorias con la actividad de la enfermedad.

Metodología: En primera instancia se puso a punto un modelo murino de CIA caracterizando la respuesta inmune inflamatoria, humoral y celular, local y sistémica, posteriormente evaluando el papel de las ROS en un modelo murino deficiente de NOX2. Por otro lado, llevamos a cabo un abordaje complementario que consistió en la evaluación del rol de los monocitos en la producción de ROS en pacientes con AR establecida, correlacionando estas variables con la actividad de la enfermedad.

Resultados: Nuestros resultados indican que la producción de ROS dependiente de NOX2 atenúa la inflamación y los signos clínicos al disminuir las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas en la artritis inducida por colágeno en ratones. También informamos que la producción de ROS por monocitos clásicos y no clásicos circulantes de pacientes con AR se correlaciona negativamente con los síntomas de la enfermedad.

Conclusión: La AR está asociada a un estado inflamatorio sistémico y articular, caracterizado por un aumento de monocitos circulantes y macrófagos tisulares de fenotipo proinflamatorio (M1) productores de ROS, siendo estas responsables de la mejoría sintomática correlacionando negativamente con la actividad clínica de la enfermedad.

Perspectivas: Las ROS producidas por diferentes subpoblaciones de monocitos en la sangre periférica podrían considerarse biomarcadores útiles o predictores de la respuesta inmunitaria asociada con la actividad de la enfermedad en AR. Es relevante continuar esta línea de investigación, evaluando en forma detallada el perfil celular monocito-macrofágico en el modelo de animales deficientes de NOX2, así como ampliando el número de pacientes de estudio.

Índice

Abreviaturas	6
Agradecimientos	8
Introducción	10
Descripción clínica	10
Inmunopatogenia	25
Hipótesis	38
Objetivos	38
Metodología	39
Módulo básico	39
Módulo clínico	51
Resultados	54
Discusión y perspectivas	89
Conclusión general	97
Bibliografía	98

Anexo 1. Criterios clasificatorios EULAR/ACR 2010

Anexo 2. Aprobación CHEA

Anexo 3. Toma de conocimiento aprobación por consejo Fmed

Anexo 4. Consentimiento informado

Anexo 5. Hoja de información para el paciente

Anexo 6. Formulario de recolección de datos

Anexo 7. Aprobación del comité de ética del Hospital Maciel

Anexo 8. Datos clínicos modelo murino de CIA tabulados

Anexo 9. Estrategia de Gating

Numeración y título de figuras

Figura 1. Signos clínicos de artritis.

Figura 2. Secuelas osteoarticulares de la AR.

Figura 3. Diagrama de flujo de tratamiento

Figura 4. Score DAS28

Figura 5. Ontogenia de macrófagos.

Figura 6. Fenotipos monocitarios.

Figura 7. Fenotipos de macrófagos.

Figura 8. Tabla de referencia propia para la evaluación de signos clínicos de artritis posterior a la inmunización y booster con colágeno de tipo II de gallina.

Figura 9. Evaluación clínica de artritis en el modelo murino inducido por colágeno.

Figura 10. Evaluación clínica de artritis para la tanda 4.

Figura 11. Validación clínica y paraclínica del modelo murino de CIA.

Figura 12. Evaluación de la respuesta humoral a la inmunización con colágeno tipo II de gallina en ratones C57BL/6.

Figura 13. Correlación entre títulos de anticuerpos contra colágeno tipo II de gallina y score clínico al D58.

Figura 14. Comparación de ganglios linfáticos inguinales.

Figura 15. Evaluación de la respuesta celular adaptativa.

Figura 16. Determinación de concentración de citoquinas inflamatorias en plasma de ratones artríticos.

Figura 17. Resultados del hemograma básico.

Figura 18. Correlación entre el conteo plaquetario y el Score clínico.

Figura 19. Porcentaje de poblaciones celulares.

Figura 20. Identificación de células mieloides en sangre periférica.

Figura 21. Identificación de células CD11b⁺ en células articulares.

Figura 22. Identificación de células F4/80⁺ IRF5⁺ en articulación.

Figura 23. Evaluación por qRT-PCR de enzimas claves en ambiente inflamatorio/anti inflamatorio.

Figura 24. Evaluación del perfil clínico e inmunológico en el modelo de AR deficientes de ROS.

Figura 25. Resultados del hemograma básico para el modelo deficiente en ROS.

Figura 26. Resultados del hemograma básico modelo clínico.

Figura 27. Determinación de la tendencia de variabilidad de los ratios MRL % y NLR % en función de la categorización de la actividad de la enfermedad.

Figura 28. Validación de aspectos clínicos y paraclínicos.

Figura 29. Determinación por ELISA sandwich de concentración de citoquinas en plasma de pacientes y controles.

Figura 30. Evaluación del comportamiento de la concentración sérica de IL-6 e IL-8.

Figura 31. Estrategia de gating para la selección de diferentes subpoblaciones de monocitos en PBMC.

Figura 32. Caracterización de poblaciones monocíticas provenientes de la purificación de PBMCs.

Figura 33. Ejemplos de histogramas de MFI.

Figura 34. Relación entre parámetros celulares, inflamatorios y anti-inflamatorios según clasificación de actividad de la enfermedad.

Figura 35. Evaluación de poblaciones linfocíticas provenientes de la purificación de PBMCs de pacientes y controles.

Figura 36. Estrategia de gating para la identificación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

Numeración y título de tablas

Tabla 1. Score clínico de artritis.

Tabla 2. Anticuerpos para citoquinas.

Tabla 3. Diseño de mixes para FACS sangre (modelo murino).

Tabla 4. BD Accuri™ C6 - BD Biosciences Láser y Fluoróforos recomendados.

Tabla 5. Diseño general para una Mix de anticuerpos de FACS.

Tabla 6. Diseño de mixes para FACS articular (modelo murino).

Tabla 7. Genes y secuencias target para qRT-PCR.

Tabla 8. Anticuerpos para detección de citoquinas (humanos).

Tabla 9. Diseño de mixes para FACS PBMCs (humanos).

Tabla 10. Caracterización descriptiva de pacientes y controles.

Tabla 11. Evaluación de variables confusoras.

Tabla 12. Variables relacionadas a la enfermedad en pacientes con AR.

Tabla 13. Caracterización y categorización de los pacientes según score de actividad.

Abreviaturas

AID - Artritis Idiopática Juvenil
AINEs - Antiinflamatorios No Esteroideos
APC - Célula Presentadora de Antígenos
AR - Artritis Reumatoide
CDAI - Clinical Disease Activity Index
CCL - Quimioquina Ligando de Receptor CC
CCLR - Receptor de Quimioquina Ligando CC
CCP - Péptidos Cíclicos Citrulinados
CFA - Adyuvante Completo de Freund
CHEA - Comisión Honoraria de Experimentación Animal
CIA - Artritis Inducida por Colágeno
CMV - Citomegalovirus
CNEA - Comisión Nacional de Experimentación Animal
CXCL - Quimioquina Ligando de Receptor CXC no
CXCLR - Receptor de Quimioquina Ligando CXC
DAS - Disease Activity Score
EAS - Enfermedades Autoinmunes Sistémicas
EGA - Evaluator Global Assessment
EBV - Virus de Epstein-Barr
FACS - Fluorescence Activated Cell Sorting
FAMEs - Fármacos Modificadores de la Enfermedad
FBS - Fetal Bovine Serum (Suero Fetal Bovino)
FMO - Fluorescence Minus One (Fluorescencia Menos Uno)
FNR - Fondo Nacional de Recursos
FR - Factor Reumatoideo
GM-CSF - Factor Estimulante de Colonias Granulomonocíticas
Hep B - Virus de Hepatitis B
Hep C - Virus de Hepatitis C
HLA - Antígeno Leucocitario Humano
HM - Hospital Maciel
HO-1 - Hemooxigenasa 1
IL - Interleucina
iNOS - Óxido Nítrico Sintasa Inducible
JAK - Cinasas Jano
K.O - Knockout
LES - Lupus Eritematoso Sistémico
LIMV - Laboratorio de Inmunomodulación y Vacunas

M-CSF - Factor Estimulante de Colonias Monocíticas
NF-κB - Factor Nuclear Kappa B
NOX2 - NADPH Oxidasa 2
NOS - Óxido Nítrico Sintasa
OA - Osteoartritis
PGA - Patient Global Assessment (Evaluación Global del Paciente)
PBMC - Células Mononucleares de Sangre Periférica
PBS - Buffer Fosfato Salino
PCR - Proteína C Reactiva
p value - Valor p
RNS - Especies Reactivas del Nitrógeno
RR - Riesgo Relativo
ROS - Especies Reactivas del Oxígeno
SEM - Standard Error of the Mean (Error Estándar de la Media)
SS - Síndrome de Sjögren
Th - Linfocito T Helper
TNF - Factor de Necrosis Tumoral
Treg - Linfocito T Regulador

Agradecimientos

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo, la guía y la colaboración que recibí a lo largo del camino.

En primer lugar agradecer a Cecilia y Laura, estoy seguro que sin que ellas sembraran la semilla de la investigación y la docencia, no hubiese recorrido este camino.

Teresa representa un pilar fundamental de todo este trabajo, de mi formación como investigador y docente. Agradezco especialmente la comprensión y apoyo en los momentos más difíciles, la dedicación incansable y la escucha. La seguridad con la que siento que transité este camino depende totalmente de haberla tenido a mi lado siempre. Es difícil ser receptivo frente a las tantas propuestas, ideas, quejas, comentarios o pavadas que uno dice, por siempre tener una respuesta amigable, gracias.

Carolina es la persona que más marcó mi carrera de grado, además, me recibió con los brazos abiertos en la policlínica en julio del 2018, para explicarme cómo hacer la semiología más larga de la vida. Casi seis años después, tengo grabado a fuego como sacar flechitas para pensar las etiologías de las agrupaciones sindromáticas. Es para mí un privilegio y una alegría inmensa haber compartido todos estos años con ella como tutora del posgrado.

Gracias a Sandra por su apoyo incondicional, por ser la fuente máxima de conocimiento en autoinmunidad clínica y por siempre brindarlo en un contexto amigable, horizontal y con la mejor de las ondas. Tengo guardado el primer esquema de etiología del síndrome poliarticular en papel camilla.

Contar con el apoyo de mi familia y amigos fue clave durante todo este tiempo, especialmente por su marcado interés y darme siempre para adelante, especialmente a mi madre, quien hizo un incansable esfuerzo por entender la temática de este proyecto así como por haber sido el Control n°1.

Especiales gracias a Miguel, quien siempre me brindó su apoyo incondicional, coca y comida rica para los momentos de estrés y cariño para los tiempos difíciles. Imposible dar tantos pasos seguidos sin la mejor persona a mi lado. Muchas muchas gracias.

Sin dudas este proyecto no podría haber sido llevada a cabo sin la participación de todos los pacientes, que frente al padecimiento de su enfermedad y lo que ella implica, brindan su tiempo y paciencia para poder llevar adelante este trabajo de

forma honoraria. También es importante agradecer a todo el equipo de extracciones del Hospital Maciel, por brindar una mano experta siempre que fue necesaria. Agradecer a Anderson por trabajar en equipo a la distancia, de una manera tan articulada que la distancia es despreciable.

Gracias a todos mis compañeros de la Unidad Académica de Inmunobiología, por hacer del trabajo duro y largo, siempre un trabajo colectivo, codo a codo y lejos de ser una tarea solitaria. Merece especial agradecimiento Moni, quien trabajó conmigo incontables horas y estuvo desde el primer día para enseñarme y ayudarme.

El apoyo económico me brindó la posibilidad de poder dedicarme de forma exclusiva a este trabajo, quitando el estrés económico de estar recién recibido y no tener que buscar trabajo en algo que seguro no me llenaba tanto como este proyecto. Por lo previamente mencionado es mandatorio agradecer a la Comisión de Apoyo a Posgrados.

Agradecer también al tribunal, por la evaluación exhaustiva de este trabajo y por la buena disposición para hacer de esta instancia gratificante.

Introducción

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica, sistémica, autoinmune de etiología desconocida, que afecta principalmente a las articulaciones sinoviales. De no ser tratada, da lugar a remodelación articular, como consecuencia de una erosión progresiva del cartílago y el hueso, conduciendo al desarrollo de secuelas articulares que generan gran morbilidad.

A continuación profundizamos en la sección introducción, que se divide en dos grandes bloques: una primera sección centrada en la **descripción clínica** de la enfermedad y una segunda enfocada en la **inmunopatogenia** de la enfermedad y sus aspectos más relevantes para este trabajo.

Descripción Clínica

Aspectos epidemiológicos y antecedentes

La AR representa la forma más frecuente de artritis, con una prevalencia de hasta 1% de la población general [\(1\)](#). La afección es tres veces más frecuente en el género femenino que en el masculino, si bien puede observarse a cualquier edad, predomina entre los 40 y 50 años [\(2\)](#).

Un estudio realizado [\(3\)](#) en el Hospital Maciel (HM) que incluyó 83 pacientes con AR, de una población de 339 pacientes con Enfermedades Autoinmunes Sistémicas (EAS), mostró a la AR como segunda EAS más frecuente siguiendo al lupus eritematoso sistémico (LES). El 87% de los pacientes eran mujeres y el 13% hombres. La edad promedio fue de 59.1 años, en un rango de 27 a 80 años. La duración media de la enfermedad antes del primer tratamiento con Fármacos Modificadores de la Enfermedad (FAMEs) fue de 8 meses, con un seguimiento promedio de 10 años. Una de cada tres pacientes presentaba solapamiento con otra EAS siendo el LES el más frecuente y el Síndrome de Sjogren (SS) en segundo lugar.

Desde las primeras descripciones de la enfermedad, padecerla representa un factor de riesgo para múltiples desenlaces desfavorables [\(4\)](#), los cuales pueden ser prevenidos por un diagnóstico precoz y tratamiento oportuno. Para contextualizar la problemática de la enfermedad es importante remarcar algunos aspectos relevantes:

La AR puede conducir a una alta **morbimortalidad** [\(4\)](#), la cual puede ser prevenida mediante un diagnóstico temprano y un tratamiento adecuado y oportuno. Para valorar la magnitud de esta problemática, resulta fundamental destacar algunos aspectos clave:

Discapacidad laboral: el impedimento de la función articular dificulta la realización de varias actividades que se realizan diariamente. Alrededor de un 40% de los pacientes con AR tienen impedimentos formales para trabajar a los 10 años del diagnóstico (5). El autor George W. Balfour, en su publicación (6) en el Edinburgh Medical Journal en 1845 se refiere a la repercusión de la enfermedad de la siguiente manera: “...*hay pocas enfermedades que merezcan más su atención cuidadosa que la artritis reumatoide; no por su mortalidad, ya que no tiende a acortar la vida, sino por el sufrimiento que produce y la invalidez que resulta de ella...*”, persistiendo hasta el día de hoy, pacientes que aún se encuentran en padecen este escenario.

Reducción en la calidad de vida: pacientes diagnosticados con AR tienen una menor calidad de vida física y mental comparadas con la población general (7).

Cirugías de reemplazo articular: en países desarrollados, hasta un 25% de pacientes con AR realizan al menos una cirugía de reemplazo articular dentro de los 20 años desde el diagnóstico de la enfermedad (8).

Desarrollo de enfermedades crónicas: en este escenario, los pacientes tienen mayor probabilidad de desarrollar enfermedades crónicas, incluyendo desde las que están estrictamente asociadas a la enfermedad (manifestaciones extraarticulares) (9), al tratamiento (10), así como también enfermedades cardiovascular y hasta patologías neoplásicas (11).

Mortalidad prematura: la sobrevida global se encuentra disminuida en pacientes con AR en comparación con la población general, pero compartiendo las mismas causas de muerte en frecuencia (12).

Etioopatogenia

Es una enfermedad multifactorial en donde intervienen factores genéticos y epigenéticos, ambientales, hormonales e inmunológicos. En lo que respecta al componente genético, existen estudios que muestran un riesgo de desarrollar AR del 50% en gemelos monocigóticos. Se han identificado asociaciones genéticas específicas, como el antígeno leucocitario humano (HLA) DR4 y DRB1, centrales en la susceptibilidad genética a la AR. Otros marcadores genéticos identificados mediante estudios de asociación de genoma completo incluyen el gen STAT4 y el locus CD40, que contribuyen a la susceptibilidad a la AR y otras EAS (13). Por otro lado, entre los factores ambientales se destaca el tabaco, las infecciones y la microbiota. El humo de tabaco es capaz de interactuar con genes que incrementan la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad, siendo uno de los principales mecanismos involucrados la citrulinización de proteínas (14).

De los datos epidemiológicos se desprende la asociación entre el sexo femenino y la enfermedad, por lo cual el eje hormonal, la patogenia y la actividad de la enfermedad (*como definiremos más adelante*) han sido vinculadas. A modo de ejemplificar algunas de estas asociaciones, el embarazo a menudo provoca remisión de la AR, probablemente debido a los mecanismos que potencian la tolerancia inmunológica desarrollados en el contexto de la gestación [\(15\)](#). El uso de anticonceptivos orales no se ha demostrado que afecta el riesgo de AR. Algunos estudios evidencian como factores protectores de desarrollo de AR a la mayor paridad y a la lactancia materna de más de 24 meses, demostrando un rol hormonal en la patogenia de esta enfermedad [\(16\)](#).

Algunas infecciones virales se han asociado con un aumento en la incidencia de AR tales como el virus de Epstein-Barr (EBV), rubéola, citomegalovirus (CMV) y el virus de la hepatitis C (HepC). Estos virus pueden actuar como disparadores, especialmente en individuos con una predisposición genética a enfermedades autoinmunes, generando una respuesta inmune desregulada que lleva a la inflamación crónica, característica de la autoinmunidad [\(17\)](#).

La microbiota intestinal influye en el equilibrio del sistema inmunológico, modulando las proporciones de linfocitos Th17 y T reguladores (TReg) principalmente a nivel intestinal. Estos fenotipos son necesarios para mantener la homeostasis y evitar respuestas a antígeno de la dieta manteniendo la tolerancia oral. Si bien inicialmente se asoció la disbiosis con enfermedades inflamatorias intestinales, actualmente se reconoce su implicancia en patologías autoinmunes sistémicas como la AR. En este contexto el balance fenotípico de la inmunidad adaptativa es crítico, ya que un aumento en la actividad de los Th17, junto con una disminución de los TReg, favorece la inflamación crónica y el desarrollo de la autoinmunidad [\(18\)](#).

Estudios en modelos experimentales han demostrado que la microbiota bacteriana es esencial para la maduración de los Th17 en la mucosa intestinal. La disbiosis, caracterizada por alteraciones en la composición microbiana, puede contribuir a la hiperactivación del sistema inmune, promoviendo la producción de citocinas proinflamatorias como IL-17, IL-6 y TNF- α , que desempeñan un papel clave en la patogenia de la AR [\(18\)](#) [\(19\)](#).

La identificación de microorganismos específicos involucrados en la activación o regulación del sistema inmune podría abrir nuevas estrategias terapéuticas basadas en la modulación del microbioma para reducir la inflamación y restablecer la tolerancia inmunológica en pacientes con AR [\(19\)](#).

Presentación clínica

Desde el punto de vista clínico existen múltiples presentaciones de la AR. La presentación clínica más frecuente es aquella que se manifiesta con un síndrome poliarticular (involucra múltiples articulaciones simultáneamente) en donde se puede evidenciar signos clínicos de la inflamación, siendo: el edema, el rubor, el calor, el dolor y la pérdida funcional ([Figura 1](#)). Dentro de las manifestaciones clínicas que integran este síndrome, varias merecen ciertas consideraciones clínicas. El dolor articular, es característicamente inflamatorio, con peoría en el reposo y alivio con el movimiento. Generalmente se acompaña de rigidez matinal, siendo altamente orientadora si es prolongada, mayor a 30 minutos. En lo que respecta a la localización puede comprometer pequeñas, medianas y grandes articulaciones, siendo las articulaciones interfalángicas proximales, metacarpofalángicas y puños las más comúnmente involucradas. Otros pacientes pueden mostrar al diagnóstico marcadas deformaciones articulares e incapacidad funcional debido a que no han tenido un diagnóstico temprano ni tratamiento oportuno ([Figura 2](#)). A su vez, es de destacar que el compromiso extraarticular es otra forma de presentación clínica de estos pacientes, pudiendo afectar diversos órganos y sistemas. De estar presente nos habla de una mayor severidad y mortalidad de la AR.

Figura 1.



Figura 1. Signos clínicos de artritis. Edema de las articulaciones metacarpofalángicas derechas. (Foto autorizada para ser utilizada para fines académicos - Fuente propia).

Figura 2.



Figura 2. Secuelas osteoarticulares de la AR. Se denota desviación cubital de los dedos con subluxaciones de la MCF y pulgar en ojal. *(Foto autorizada para ser utilizada para fines académicos - Fuente propia).*

Pruebas diagnósticas

Las enfermedades autoinmunes, como la AR, a menudo se caracterizan por la presencia de autoanticuerpos, lo que corresponde un pilar humoral diagnóstico, si bien su ausencia no descarta la enfermedad. El factor reumatoide (FR) y los anticuerpos contra proteínas citrulinadas (CCP) son los dos autoanticuerpos presentes en los criterios clasificatorios. El FR no es específico de la AR y puede estar presente en pacientes con otras EAS, neoplasias o infecciones. Su sensibilidad reportada en un meta análisis fue de 69% (IC 65-73) elevando su sensibilidad a 89% cuando se presenta a títulos altos (tres veces más del valor normal) [\(20\)](#),

Los anticuerpos contra proteínas citrulinadas (CCP) son más específicos para la AR [\(21\)](#). Los anti-CCP tiene una sensibilidad entre el 70-75% y una especificidad mayor al 90% [\(22\)](#). Aproximadamente entre el 50 al 80% de las personas con AR tienen FR positivo, anticuerpos contra CCP, o ambos positivos [\(23\)](#). Habiendo un porcentaje de pacientes con AR seronegativa.

Tanto el FR como el CCP han demostrado ser predictores del desarrollo de la enfermedad, ya que su presencia puede ser detectada años antes de la aparición de los síntomas clínicos. A su vez, la positividad de estos autoanticuerpos tiene valor pronóstico, evidenciándose que a mayor título, peor pronóstico. En la cohorte de pacientes del HM [\(3\)](#) se identificó que el 84% de los casos tenían FR positivo y el 73% contaban con anticuerpos anti-CCP positivos, mientras que el 10.8% fueron catalogados como AR seronegativa.

Dentro de los otros parámetros humorales, los niveles de proteína C-reactiva (PCR) y la velocidad de sedimentación de eritrocitos (VES) a menudo están elevados en la AR [\(24\)](#), siendo incluidos dentro de los criterios clasificatorios.

Criterios clasificatorios:

En el 2010, el Colegio Americano de Reumatología (ACR) y la Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR) colaboraron para crear criterios de clasificación para la AR [\(Anexo 1\)](#). Estos criterios marcan una franca tendencia en el esfuerzo por diagnosticar la AR más temprano en pacientes que no cumplen con los criterios clasificatorios previos de 1987 del ACR. Los criterios de 2010 no incluyen la presencia de nódulos reumatoides ni cambios radiográficos erosivos, ambos menos probables en la AR temprana. La artritis simétrica tampoco es requerida en los criterios de 2010, lo que permite una presentación temprana asimétrica u oligoarticular. Estos criterios toman en cuenta cuatro ítems, a saber: distribución articular, duración de síntomas, reactantes de fase aguda, autoanticuerpos. La presencia de un puntaje de 6 o más permite clasificar para la enfermedad.

Tratamiento

Los objetivos de la terapia incluyen minimizar los síntomas, modificar la enfermedad (pronóstico), tratar y prevenir complicaciones para así lograr mantener la calidad de vida personal y laboral.

Las guías de la práctica clínica han abordado el manejo de la AR, para el inicio del tratamiento se deberá tener en cuenta distintas variables: contraindicaciones y tolerancia a fármacos, comorbilidades, severidad, actividad de la enfermedad y último pero no menos importante la preferencia del paciente [\(25\)](#). Es así que se deberá tratar para lograr un objetivo terapéutico o “treat to target” individualizado a cada paciente, siendo el “ideal”: la remisión de la enfermedad. Para esto, el médico debe basarse en la **clinimetría** seriada del paciente, teniendo en cuenta los parámetros de actividad de la enfermedad (DAS28) [\(26\)](#).

A modo de remarcar las dificultades en el tratamiento y su manejo, se presenta nuevamente una cita del Dr. Balfour en la primera publicación formal sobre la AR [\(6\)](#): *“Sabiedo las dificultades que enfrentamos al intentar tratar racionalmente cualquier enfermedad, incluso cuando tiene una patología definida, podrían preguntarse sobre qué principios podemos esperar tratar con esperanza una enfermedad como esta, tan rica en su anatomía patológica y tan oscura en su patología. Sin embargo, podría responderse bien que, incluso cuando la patología de una enfermedad es mejor conocida, nuestro tratamiento más exitoso suele ser solo un empirismo exitoso, cuyo modo de acción ha recibido una explicación variable en cada época sucesiva; y solo en los casos más raros podemos demostrar efectivamente una conexión racional entre la administración de un remedio y su supuesta acción curativa.”*

El tratamiento de la AR incluye:

- 1) Medidas generales: En cuanto al ejercicio y la fisioterapia, los ensayos controlados aleatorios respaldan el ejercicio físico para mejorar la calidad de vida y la fuerza muscular en pacientes con AR. [\(27\)](#), [\(28\)](#), [\(29\)](#). El abandono del hábito tabáquico es otro de los pilares terapéuticos. Como se mencionó anteriormente, el humo de tabaco lleva a un aumento de la conversión de arginina en citrulina con el consiguiente incremento de la citrulinización de las proteínas, empeorando la actividad de la enfermedad.
- 2) Antiinflamatorios: Antiinflamatorios No Esteroideos (AINES) y corticoides. Sabiendo que los mismos no mejoran la mortalidad.
- 3) FAMEs: son el pilar del tratamiento de esta enfermedad dado que modifican la enfermedad y disminuyen la mortalidad.

AINEs y corticoesteroides

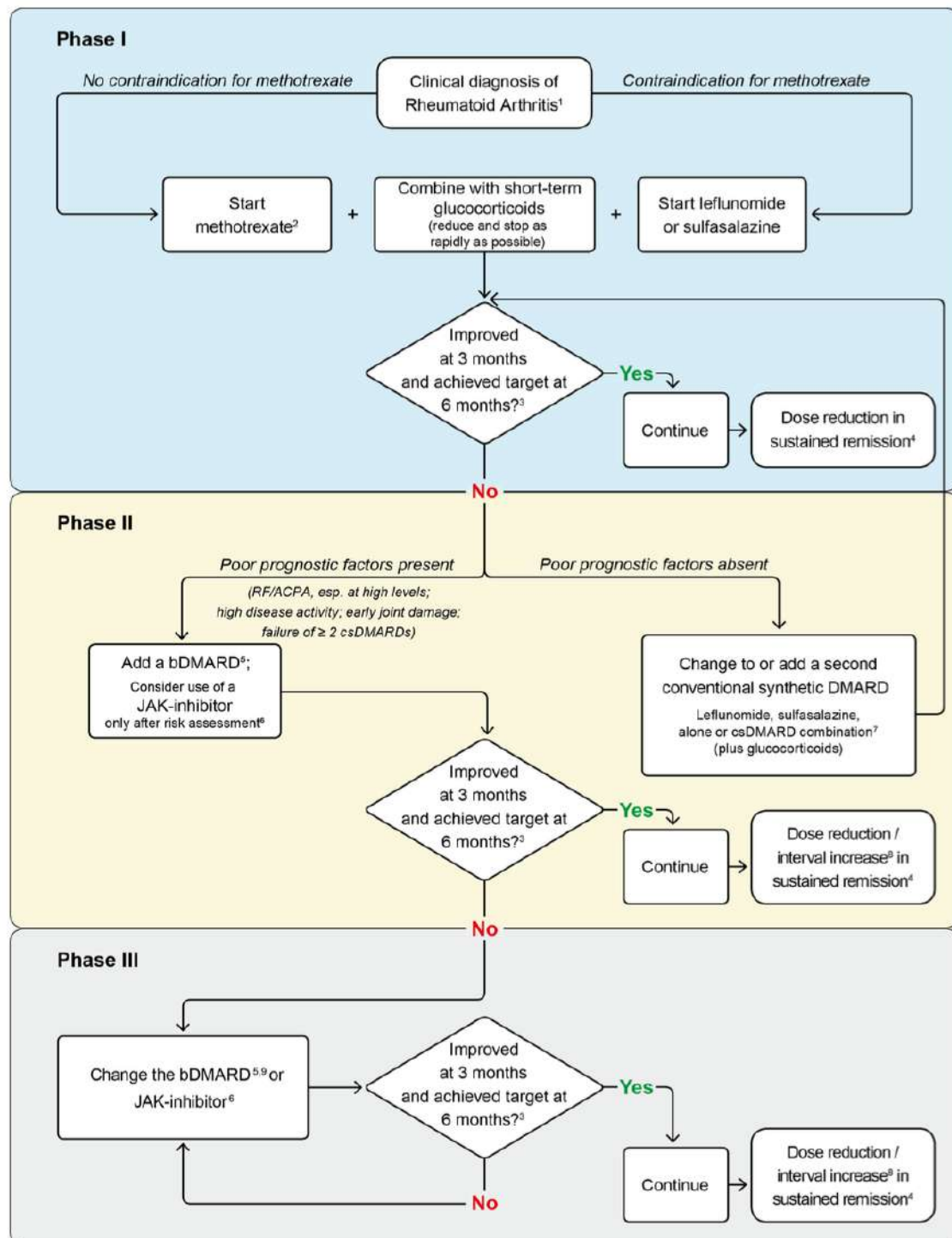
El tratamiento sintomático para la AR puede incluir AINEs y corticosteroides orales o intraarticulares para controlar el dolor y la inflamación. Se deberán iniciar siempre asociados a un FAME, dado que los antiinflamatorios no disminuyen la mortalidad. En el caso de los corticoides se recomienda asociar a dosis bajas y por el menor tiempo posible, dado a los grandes efectos adversos que presentan.

FAMEs

Los FAMEs son la base del tratamiento de la AR, pudiendo ser sintéticos (convencionales o dirigidos) o biológicos [\(30\)](#). Los agentes biológicos incluyen anticuerpos monoclonales y receptores recombinantes para bloquear las citoquinas que promueven la cascada inflamatoria que interviene en la patogenia de la AR. En el grupo de fármacos sintéticos convencionales el metotrexate es recomendado como tratamiento de primera línea en pacientes con AR, a menos que esté contraindicado o sea mal tolerado [\(25\)](#). En este último caso la leflunomida o la sulfasalazina pueden ser una buena estrategia terapéutica [\(31,32\)](#).

En aquellos casos donde a los 3-6 meses no se logre el objetivo terapéutico planteado para el paciente se deberá rotar a fármacos sintéticos dirigidos o biológicos [\(26,31\)](#) como se evidencia en la [Figura 3](#) a continuación:

Figura 3.



1. 2010 ACR-EULAR classification criteria can support early diagnosis.

2. "Methotrexate should be part of the first treatment strategy". While combination therapy of csDMARDs is not preferred by the Task Force, starting with methotrexate does not exclude its use in combination with other csDMARDs although more adverse events without added benefit are to be expected, especially if MTX is combined with glucocorticoids.

3. The treatment target is clinical remission according to ACR-EULAR definitions or, if remission is unlikely to be achievable, at least low disease activity; the target should be reached after 6 months, but therapy should be adapted or changed if insufficient improvement (less than 50% of disease activity) is seen after 3 months.

4. Sustained remission: ≥ 6 months ACR-EULAR index based or Boolean remission.

5. Consider contraindications and risks. TNF-inhibitors (adalimumab, certolizumab, etanercept, goimumab, infliximab, including EMA/FDA approved bDMARDs), abatacept, IL-6R inhibitors, or rituximab (under certain conditions); in patients who cannot use csDMARDs as comedication IL-6-inhibitors and tsDMARDs have some advantages.

6. The following risk factors for cardiovascular events and malignancies must be considered when intending to prescribe a JAK-inhibitor: Age over 65 years, history of current or past smoking, other cardiovascular risk factors (such as diabetes, obesity, hypertension), other risk factors for malignancy (current or previous history of malignancy other than successfully treated NMSC), risk factors for thromboembolic events (history of MI or heart failure, cancer, inherited blood clotting disorders or a history of blood clots, as well as patients taking combined hormonal contraceptives or hormone replacement therapy, undergoing major surgery or immobile).

7. The most frequently used combination comprises methotrexate, sulfasalazine and hydroxychloroquine.

8. Dose reduction or interval increase can be safely done with all bDMARDs and tsDMARDs with little risk of flares; stopping is associated with high flare rates, most but not all patients can recapture their good state upon re-institution of the same bDMARD/tsDMARD, but before all this glucocorticoids must have been discontinued.

9. From a different or the same class.

Figura 3. Diagrama de flujo. ACR: Colegio Americano de Reumatología; bDMARDs: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad biológicos; csDMARDs: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad sintéticos convencionales; FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos; JAK: Janus quinasa; MTX: metotrexato; NMSC: cáncer de piel no melanoma; tsDMARDs: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad sintéticos dirigidos. Extraída de [\(26\)](#)

Dentro de las terapias biológicas se cuenta con: los inhibidores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) alfa, anti-IL6, Anti-IL-1, bloqueadores de la coestimulación, o anti-CD20 [\(25\)](#).

Por otro lado se encuentran los sintéticos dirigidos siendo los inhibidores de la Janus kinasa (anti-Jak) [\(25\)](#)..

Situación en Uruguay

En Uruguay, el Fondo Nacional de Recursos (FNR) cubre el tratamiento de la AR con medicamentos de alto costo, como los biológicos y sintéticos dirigidos. entre las terapias biológicas en el Uruguay contamos con : Adalimumab (anti-TNF), Etanercept (anti-TNF, proteína de fusión E), Golimumab (anti-TNF), Infliximab (anti-TNF), Rituximab (anti-CD20), Tocilizumab (anti-IL-6, receptor de interleucina-6). Entre los sintéticos dirigidos: Tofacitinib (inhibidor JAK) y Upadacitinib (inhibidor de JAK). La cobertura está sujeta a un protocolo que establece criterios específicos de inclusión y exclusión, así como pautas de administración y seguimiento [\(2\)](#). Los pacientes deben presentar historia clínica completa, cumplir con estudios paraclínicos y seguir pautas de vacunación. La normativa incluye una evaluación trimestral de la efectividad y seguridad del tratamiento, y establece condiciones para la rotación o suspensión de medicamentos en caso de ineficacia o efectos adversos, asegurando un tratamiento personalizado y seguro para los pacientes con AR.

Evaluación de la actividad de la enfermedad

Al tratarse de una enfermedad crónica y que cursa con períodos de actividad variable, es necesario contar con un instrumento que nos permita determinar la evolución de la enfermedad, especialmente en relación a las intervenciones terapéuticas, permitiendo un manejo más estandarizado de tan compleja patología.

La creación de instrumentos para evaluar estructuradamente la actividad de la enfermedad incluyen medidas compuestas que integran varias variables clínicas y de laboratorio claves, permitiendo una evaluación cuantitativa estandarizada.

La mayoría de los principales conjuntos de variables validados [\(32\)](#) para este propósito incluyen:

Conteo de articulaciones inflamadas y dolorosas: Las articulaciones se evalúan según dos características:

- Tumefacción articular (conteo de articulaciones inflamadas **NAT**).
- Dolor al presionar o mover (conteo de articulaciones dolorosas **NAD**).

Es de destacar que no pondera las articulaciones por su tamaño ni se califican por el grado de edema así como tampoco valora las articulaciones de los pies.

Dolor medido por paciente o médico: El dolor suele medirse mediante evaluaciones globales del paciente y evaluador. La actividad de la enfermedad evaluada por el paciente (PGA) o el evaluador (EGA) sigue métodos de escalas numéricas o de Likert. La PGA, centrada en la experiencia del paciente, suele ser subjetiva, influenciada especialmente por el dolor. La EGA, en cambio, incorpora tanto datos subjetivos como objetivos. Los PGAs suelen puntuar más alto que los EGAs, ya que los pacientes tienden a ver la discapacidad funcional como una manifestación de la enfermedad activa, mientras que los evaluadores médicos comparan con otros casos de AR.

Reactantes de fase aguda: la respuesta inflamatoria aguda, medida por la VES y la PCR, es la medida más objetiva de actividad de la enfermedad según algunos estudios [\(33\)](#). Pese a esto, a menudo los efectos de los fármacos sobre los reactantes de fase aguda pueden alterar la interpretación de la actividad de la enfermedad, especialmente los inhibidores del receptor de IL-6 o de JAK, que reducen la producción hepática de reactantes sin necesariamente reflejar mejoría clínica, afectando la evaluación de la actividad de la enfermedad y los signos de laboratorio. Los niveles elevados de VES y PCR se correlacionan de buena forma con la actividad clínica y la progresión del daño articular [\(34\)](#). Estas pruebas son accesibles, estandarizadas y económicas.

A continuación, profundizaremos en los índices relevantes para esta investigación, el CDAI y el DAS28.

Índice de Actividad de la Enfermedad Clínica (CDAI): no requiere la medición de un reactante de fase aguda, lo que permite una rápida evaluación. Es un índice que varía de 0 a 76 y se correlaciona bien con otros puntajes de actividad de la

enfermedad [\(35\)](#) y criterios de respuesta, así como con la progresión del daño articular y la discapacidad funcional.

El CDAI se interpreta de la siguiente manera:

- <2.8: **Remisión**
- 2.8 a 10: **Baja actividad** de la enfermedad
- 11 a 22: **Actividad moderada** de la enfermedad
- >22: **Alta actividad** de la enfermedad

La ventaja del CDAI es que facilita decisiones de tratamiento inmediatas basadas completamente en criterios clínicos que incluyen la evaluación de las articulaciones.

Puntaje de Actividad de la Enfermedad utilizando 28 articulaciones (DAS28): el Puntaje de Actividad de la Enfermedad (DAS) y su modificación ampliamente utilizada, el **DAS28**, utiliza un conteo de 28 articulaciones y proporciona un puntaje global y continuo para la evaluación de la actividad de la enfermedad [\(36\)](#) [\(Figura 4\)](#). Hay calculadoras disponibles para calcular fácilmente el DAS28 utilizando la VES y la PCR.

Figura 4.

Dolor articular a la palpación

1 Número de articulaciones dolorosas

Inflamación articular

2 Número de articulaciones inflamadas

3 Eritrosedimentación en mm/h

Valoración global del paciente:
Actividad de la enfermedad

SIN ACTIVIDAD Deje que el paciente haga la evaluación indicando en el cuadro de escala MÁXIMA ACTIVIDAD

4 Evaluación del paciente en mm 25

DAS 28:

EVALUACIÓN ● 3

DAS 28: SIN RESPUESTA

Figura 4. Score DAS 28. Extraído de (37).

Definición de niveles de actividad según los puntajes DAS28:

- <2.6: **Remisión**
- 2.6 a 3.2: **Baja actividad** de la enfermedad
- 3,2 a 5.1: **Actividad moderada** de la enfermedad
- >5.1: **Alta actividad** de la enfermedad

Sin embargo, dependiendo del tratamiento utilizado, entre el 15 y el 50% de los pacientes con puntajes DAS28 de 2.6 (el punto de corte para remisión) continúan teniendo 2 o más articulaciones inflamadas; algunos incluso pueden tener más de 10 articulaciones inflamadas y aún así ser clasificados como en “remisión” utilizando este índice compuesto [\(38\)](#).

Comprender los índices de actividad y su relación con parámetros inflamatorios clínicos y paraclínicos nos permite desarrollar y caracterizar modelos matemáticos con variables experimentales, pudiendo desprendernos de la influencia de los tratamientos en particular, evaluando únicamente la actividad de la enfermedad como veremos más adelante.

Biomarcadores no tradicionales

Los biomarcadores, comúnmente llamados “marcadores biológicos”, son características biológicas que pueden ser medidas objetivamente y sirven como indicadores de procesos normales o patológicos, o como medidas de la respuesta a los tratamientos. Los Institutos Nacionales de Salud de los EE. UU. han definido un marcador biológico (biomarcador) como *“una característica que se mide y evalúa objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica”* [\(39\)](#).

La AR sigue un curso variable en cuanto a daño articular, sus manifestaciones extraarticulares y resultados funcionales, sumando el hecho de lo dificultoso que es el diagnóstico temprano. Por lo tanto, la identificación temprana de pacientes con AR y, en particular, aquellos que probablemente presenten una forma de la enfermedad más destructiva, puede ayudar a dirigir a los pacientes que tienen más probabilidades de beneficiarse de una intervención temprana y más agresiva con FAMEs. Es por esta razón que sería de suma importancia el contar con biomarcadores que ayuden a la práctica clínica diaria.

Es relevante mencionar otros marcadores evaluados:

Proteínas plasmáticas: Un estudio que valoró el rol de potenciales biomarcadores en un enfoque proteómico [\(40\)](#), evaluó 163 proteínas plasmáticas en 44 pacientes con AR para determinar cuáles estaban asociadas con la actividad de la enfermedad. Las proteínas plasmáticas cuyas concentraciones se correlacionaron con la actividad de la enfermedad incluyeron:

- **IL-6**
- Oncostatina M
- **IL-2**

- M-CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos)
- **TNF** receptor superfamily member 9 (Miembro 9 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral)
- CCL23 (C-C motif chemokine 23)
- TGF- α (Factor de crecimiento transformante alfa)
- CXCL13 (Ligando de quimiocina C-X-C motif 13)

Profundizando sobre la IL-6, esta aumenta durante la respuesta de fase aguda y los biológicos dirigidos contra IL-6 han demostrado ser efectivos en el tratamiento de la AR [\(40\)](#). La medición de los niveles de IL-6 en sangre o líquido sinovial no es utilizada en la práctica clínica rutinaria, aunque persiste el interés por realizar más investigaciones al respecto. Esto sugiere que, aunque IL-6 tiene un papel importante en la patogenia de la AR y en la respuesta al tratamiento, no es un biomarcador adecuado para el seguimiento clínico rutinario de la enfermedad.

Inmunopatogenia

Dado la intrincada patogénesis de las enfermedades autoinmunes sistémicas y sus mecanismos de cronicidad, a continuación se desglosan algunos de los aspectos más relevantes desde su desencadenamiento, hasta su vínculo con el sistema inmunológico, para finalizar profundizando en la población monocito-macrofágica de interés para el desarrollo de este trabajo.

Desencadenamiento de la enfermedad

En etapas iniciales son fundamentales los factores ambientales, que sumados a cierta predisposición o a la presencia de otros factores de riesgo, dan el puntapié inicial para el desarrollo de la enfermedad. A modo de ejemplo, el humo de cigarrillo en las vías respiratorias induce las peptidil arginina desaminasas [\(41\)](#), las cuales modifican péptidos citrulinizando argininas, siendo estos péptidos más factibles de ser procesados por células presentadoras de antígenos (APC) que en un contexto inflamatorio podrían activar linfocitos T dirigiendo a la inmunidad adaptativa contra péptidos propios [\(42\)](#).

Como fue enunciado, los anticuerpos anti-CCP y el nivel de citoquinas proinflamatorias puede preceder años al desarrollo de la enfermedad, pero aún es desconocido el gatillamiento de la sinovitis. Una teoría aceptada involucra el desarrollo de inmunocomplejos, estos aumentan la permeabilidad vascular de la cavidad sinovial permitiendo la activación de las células inmunes residentes [\(43\)](#). Esto sugiere que un “segundo golpe” es necesario para que la predisposición a la enfermedad se convierta en inflamación sinovial clínicamente evidente, donde radica la comunicación entre la inmunidad adaptativa y los mecanismos de la inmunidad

innata. En humanos, estos complejos inmunes se acumulan en las articulaciones afectadas, fijan el complemento, reclutan células innatas estimulando la inflamación [\(44\)](#). Las biopsias sinoviales en pacientes con anti-CCP positivos con sintomatología articular son esencialmente normales [\(45\)](#). Estudios recientes en biopsias han expandido el conocimiento sobre los tipos celulares, patrones de expresión génica y moléculas de señalización claves en la AR [\(46\)](#), pero aún no tienen un rol diagnóstico.

Una vez establecido el proceso inflamatorio, el tejido sinovial cambia su ambiente molecular, degradando cartílago y hueso. Este fenotipo característico de los sinoviocitos aumenta la migración interarticular, lo que podría explicar las manifestaciones simétricas articulares, así como el avance de la enfermedad [\(47\)](#).

Interacción entre inmunidad innata y adaptativa

Considerando que la AR es una patología de base autoinmune, es esencial discutir los aspectos vinculados a la inmunidad y al papel de la inmunidad innata y adaptativa en la misma. La activación de la inmunidad innata y la citrulinación de proteínas probablemente constituyen los eventos iniciales en el desarrollo de la AR. Sin embargo, la inmunidad adaptativa desencadena una actividad inflamatoria exponencial y mantenida, siendo la responsable de los períodos de variabilidad. Brevemente las APCs, activadas en un entorno inflamatorio, capturan estas proteínas modificadas y posteriormente migran hacia los órganos linfáticos periféricos, donde presentan estos péptidos más inmunogénicos a los linfocitos T.

Importancia de la inmunidad adaptativa celular T

Los linfocitos T vírgenes son activados por las APCs y se diferencian en subpoblaciones efectoras que llevan adelante la inflamación sinovial a nivel local en la articulación. Dentro de las diferentes poblaciones linfocitarias, los T corresponden hasta un 50% de las células sinoviales, siendo su fenotipo preponderantemente CD4⁺ Th1 o Th17, encontrando subrepresentado los subtipos Th2 y reguladores (Treg) [\(48\)](#). Sin embargo, el rol patogénico de los linfocitos T CD8⁺ en la AR no se encuentra esclarecido aún.

Aunque no se ha determinado un epítipo preponderante de los antígenos propios inmunogénicos presentados por las APCs en la AR, se sabe que corresponden a proteínas de la matriz extracelular que tienden a ser citrulinados o carbamilados, facilitando su presentación [\(49\)](#) a linfocitos T CD4⁺. Ejemplos de proteínas citrulinadas que se han implicado en la AR incluyen al fibrinógeno, la vimentina, la enolasa y el colágeno, cada una de las cuales puede provocar respuestas inmunológicas más eficientemente que las proteínas no modificadas [\(50\)](#). El o los antígenos iniciadores probablemente varían de un paciente a otro, quizás de una articulación a otra, y de una enfermedad temprana a una tardía en el mismo paciente.

Estos linfocitos T activos, con su marcado perfil proinflamatorio, moldean la respuesta inmune innata, como se desarrollará más adelante.

Rol de la inmunidad adaptativa humoral

Además de la producción de autoanticuerpos patogénicos, los linfocitos B contribuyen de manera significativa a la regulación de la inflamación al actuar como APCs, liberando citoquinas que modulan la expansión y diferenciación de linfocitos T y la activación de macrófagos. Del mismo modo, los linfocitos T CD4⁺ colaboradores interaccionan con los linfocitos B al reconocer en su superficie las moléculas de MHC de clase II con antígenos cargados, permitiendo así la maduración de la afinidad y el cambio de clase. Localmente, en la articulación inflamada, el perfil de citoquinas podría activar los linfocitos B al inducir su proliferación y producción de anticuerpos en ausencia de un antígeno específico [\(51\)](#).

La importancia de los linfocitos B en la patogénesis de la AR se ha puesto de manifiesto con el uso terapéutico del anticuerpo anti-CD20 Rituximab para la depleción de células B, el cual media la reducción en la actividad de la enfermedad. Sin embargo, a pesar del impacto clínico de la depleción de linfocitos B en la AR, los estudios de biopsia sinovial muestran una depleción menos efectiva de las células CD20⁺ en el tejido sinovial respecto a las circulantes en sangre, generando una marcada dificultad, dado que la depleción tisular es necesaria pero no suficiente para la eficacia clínica [\(52\)](#).

Los anticuerpos producidos por los linfocitos B, permiten una activación y una conducción de la inmunidad innata a través de los receptores Fc.

Aspectos generales sobre los monocitos-macrófagos

Considerando que los monocitos y los macrófagos son poblaciones celulares de interés para este trabajo, a continuación se detallan aspectos generales de ambas poblaciones, para luego profundizar en su relación con la AR.

Los macrófagos fueron descritos por primera vez en 1882 por Metchnikov como los “*grandes devoradores*” del sistema inmunitario, siendo soldados de primera línea gracias a su característica de ser locales/residentes y su marcada capacidad para reconocer, fagocitar y destruir patógenos a través de la activación de receptores y la producción de mediadores inflamatorios [\(53\)](#).

Los macrófagos representan una familia de leucocitos mononucleares que están ampliamente distribuidos en el cuerpo. Varían considerablemente en vida media y fenotipo dependiendo del origen y del microambiente local en el que se encuentren.

Se ha determinado un sistema fagocítico mononuclear, el cual está formado por células que poseen un linaje común, cuya función primaria es la fagocitosis (54). Este sistema consiste en células estrechamente relacionadas cuyo origen es la médula ósea y que incluye monocitos circulantes en sangre y macrófagos residentes. Las células similares a macrófagos tienen diferentes funciones en distintos tejidos y se denominaron de acuerdo a su localización tisular: macrófagos alveolares (pulmón), histiocitos (tejido conjuntivo, en nódulos linfáticos y bazo se denominan histiocitos sinusoidales), células de Kupffer (hígado), células mesangiales (riñón), células microgliales (cerebro), osteoclastos (hueso y articulaciones) siendo estas últimas a nivel articular y óseo, las células responsables de mantener la homeostasis ósea (55).

Los monocitos derivan del progenitor mieloide común, el cual se replica y diferencia para dar monocitos y, más adelante en los tejidos, macrófagos, bajo la influencia de ciertos factores de crecimiento (56) (Figura 5). Luego que ocurre el compromiso con el linaje monocítico, la célula pasa por los estadios de monoblastos y promonocitos antes de desarrollarse en un monocito maduro. Posterior a varias horas transitando en la sangre, los monocitos migran a diferentes tejidos, donde se diferencian a macrófagos de vida media relativamente larga, con escasa capacidad de migración y diferenciación limitada (57).

Figura 5.

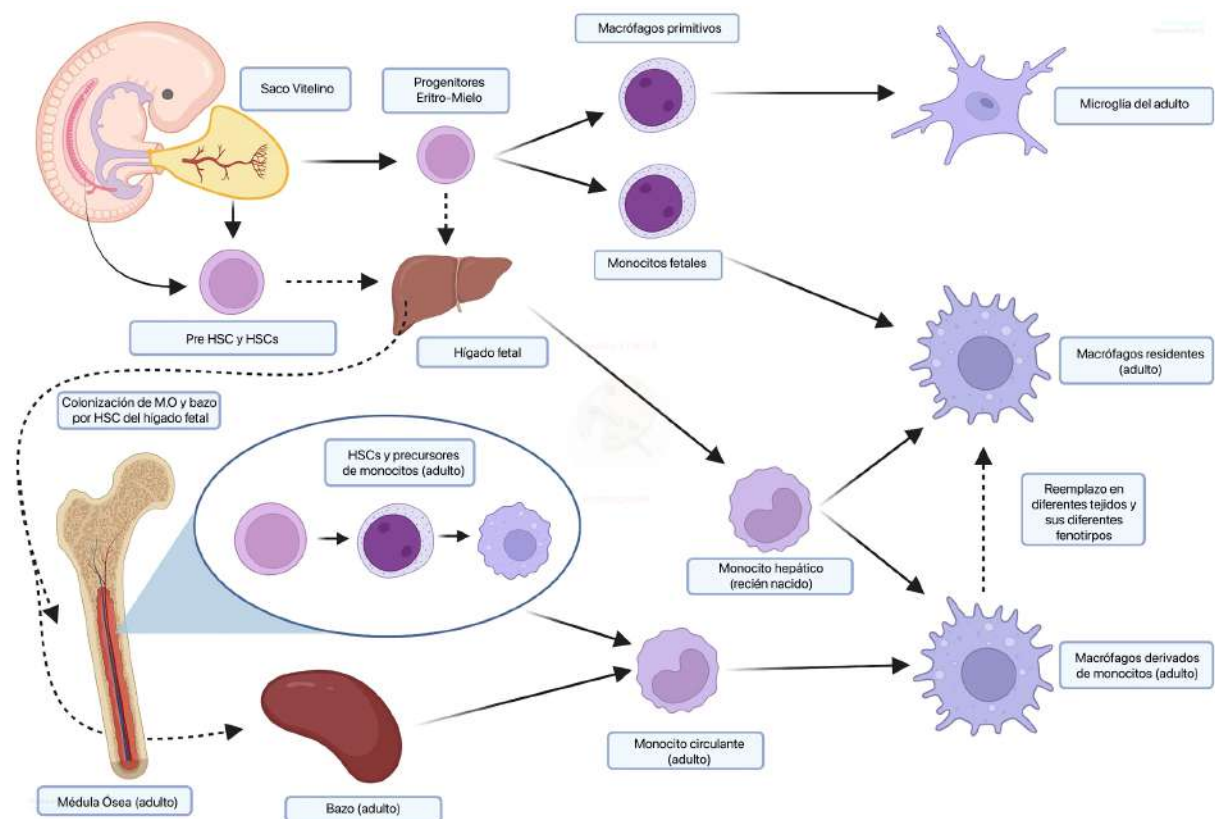


Figura 5. Ontogenia de macrófagos. Resumen de la ontogenia de macrófagos desde el desarrollo fetal hasta el adulto. Modificado de (58).

A lo largo de toda la ruta de diferenciación, las células de linaje mieloide son reguladas por un amplio número de citoquinas entre las que se encuentran: GM-CSF, M-CSF, IL-3, IL-6 e IL-11, conduciéndolas a la diferenciación hacia linajes específicos, dependiendo de la combinación de factores empleados [\(59\)](#).

En el feto, los macrófagos maduros proliferan activamente durante el remodelamiento de tejido en órganos en desarrollo. En el adulto, los macrófagos de tejido no se auto-renuevan extensamente, salvo en microambientes especializados como la epidermis, el sistema nervioso o el pulmón. La diferenciación de monocito a macrófago tisular implica un crecimiento de la célula, sus organelos intracelulares aumentan en número y complejidad, adquiere mayor capacidad fagocítica que produce concentraciones más altas de enzimas hidrolíticas y comienza a secretar una diversidad de factores solubles [\(59\)](#).

Monocitos circulantes en AR

Los monocitos desempeñan un papel crucial en la iniciación y el mantenimiento de la inflamación en el tejido sinovial de pacientes con AR. De hecho, los monocitos son reclutados desde la circulación hacia el tejido sinovial mediante quimiotaxis [\(60\)](#).

Los monocitos se clasifican en tres subgrupos principales basándonos en los marcadores CD14 y CD16. CD14 corresponde a uno de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) principales del linaje monocítico-mononuclear mientras que CD16 es el receptor para la porción Fc (FcR) de los anticuerpos, claves para la interacción entre la inmunidad adaptativa humoral (Figura 4).

1. Monocitos clásicos CD14^{high}CD16⁻
2. Monocitos intermedios CD14^{high}CD16⁺
3. Monocitos no clásicos CD14^{intermedio}CD16^{high} [\(60\)](#), [\(61\)](#).

Figura 6.

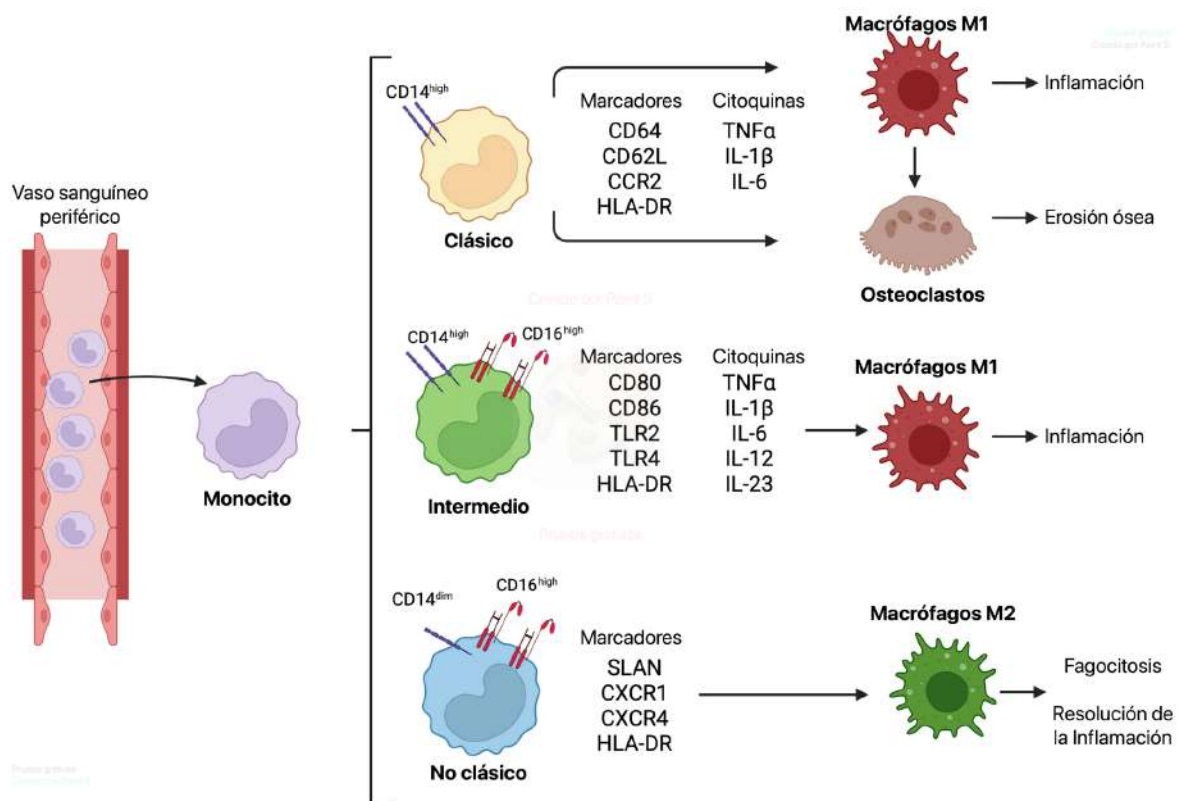


Figura 6. Fenotipos monocitarios. Resumen de la ontogenia de macrófagos desde los diferentes fenotipos monocitarios y su relación con la inflamación articular. Modificado de [\(62\)](#).

Tanto el número como el porcentaje de monocitos se encuentra aumentado en pacientes con AR a nivel local y sistémico, así como también se encuentran sobreexpresados CD14 y CD16 [\(63\)](#), [\(64\)](#), favoreciendo la población de monocitos intermedios. Se ha demostrado, que en las articulaciones sinoviales, los monocitos producidos posterior al desarrollo de la enfermedad, son los precursores de los osteoclastos responsables de la erosión ósea [\(65\)](#).

Dentro de las tres poblaciones descritas, los monocitos intermedios han sido los más estudiados en la AR, por lo que es importante puntualizar algunas observaciones:

- Tienen facilidad para diferenciarse a macrófagos M1 articulares [\(66\)](#).
- Poseen mayor expresión de HLA-DR determinando una elevada producción de TNF α [\(67\)](#).
- Expresan altos niveles de TLR2, activando la vía de señalización cascada abajo que determina la producción de citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF α [\(68\)](#).
- Sobreexpresan CD80 y CD86 favoreciendo la colaboración con linfocitos T CD4⁺ [\(60\)](#).

- Presentan mayor metilación del ADN vinculado al ambiente inflamatorio, lo que se correlaciona con la actividad de la enfermedad [\(69\)](#).

Todas estas observaciones sugieren un papel de los monocitos intermedios como biomarcadores adicionales para una alta actividad de la enfermedad en pacientes con AR.

En cuanto a los monocitos no clásicos, suelen presentar un fenotipo marcadamente diferente que a los otros dos subtipos, teniendo predilección por la diferenciación alternativa a M2 [\(70\)](#).

Macrófagos: los protagonistas de la patogenia de la AR

Aunque durante la homeostasis se encuentran en reposo, los macrófagos se activan por una diversidad de estímulos en el curso de una respuesta inmune, su crecimiento y diferenciación están estrechamente regulados por factores de crecimiento específicos e inhibidores que varían considerablemente en su potencia. La respuesta inflamatoria incipiente de la AR genera un desbalance entre estos factores, donde una directriz errónea de la inmunidad adaptativa marca un fenotipo macrofágico característico de la AR como veremos más adelante.

Durante su activación, los macrófagos liberan sustancias microbicidas y mediadores inflamatorios al medio extracelular, en particular enzimas lisosomales y especies reactivas del oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) [\(48\)](#).

Por contrapartida, los macrófagos producen factores de crecimiento que estimulan la proliferación de células endoteliales y fibroblastos, así como la síntesis de colágeno y enzimas que remodelan el tejido conectivo como las colagenasas, vinculándose con el proceso de reparación tisular. La liberación por parte de estos macrófagos de citoquinas anti-inflamatorias, incluyendo el TGFβ e IL-10, promueve una resolución tanto para la inflamación aguda como crónica [\(60\)](#).

Frente a este comportamiento dual, es importante remarcar y/o diferenciar aquellos mecanismos llevados a cabo por diferentes subpoblaciones de macrófagos. Los macrófagos pueden ser subcategorizados en poblaciones específicas en base a su localización anatómica y al fenotipo funcional. Se distinguieron inicialmente dos poblaciones macrofágicas diferenciales fenotípicamente, dependiendo del contexto de su activación, fueron denominados de activación clásica (M1) o de activación alternativa (M2). Al igual que en los monocitos previamente descritos, la plasticidad es una característica clave de los macrófagos, que les permite adoptar estos fenotipos heterogéneos. Por lo tanto, estas células no solo están involucradas en la propagación de la inflamación, sino también en su resolución. Se reconoce que los fenotipos M1 y M2 (Figura 5) representan los extremos de un espectro de activación

macrofágica, caracterizado por la presencia de “*fenotipos intermedios*” que participan en la regulación inmunológica o la reparación tisular y que se definen por diferentes vías metabólicas, marcadores de superficie y producción de citoquinas.

Figura 7.

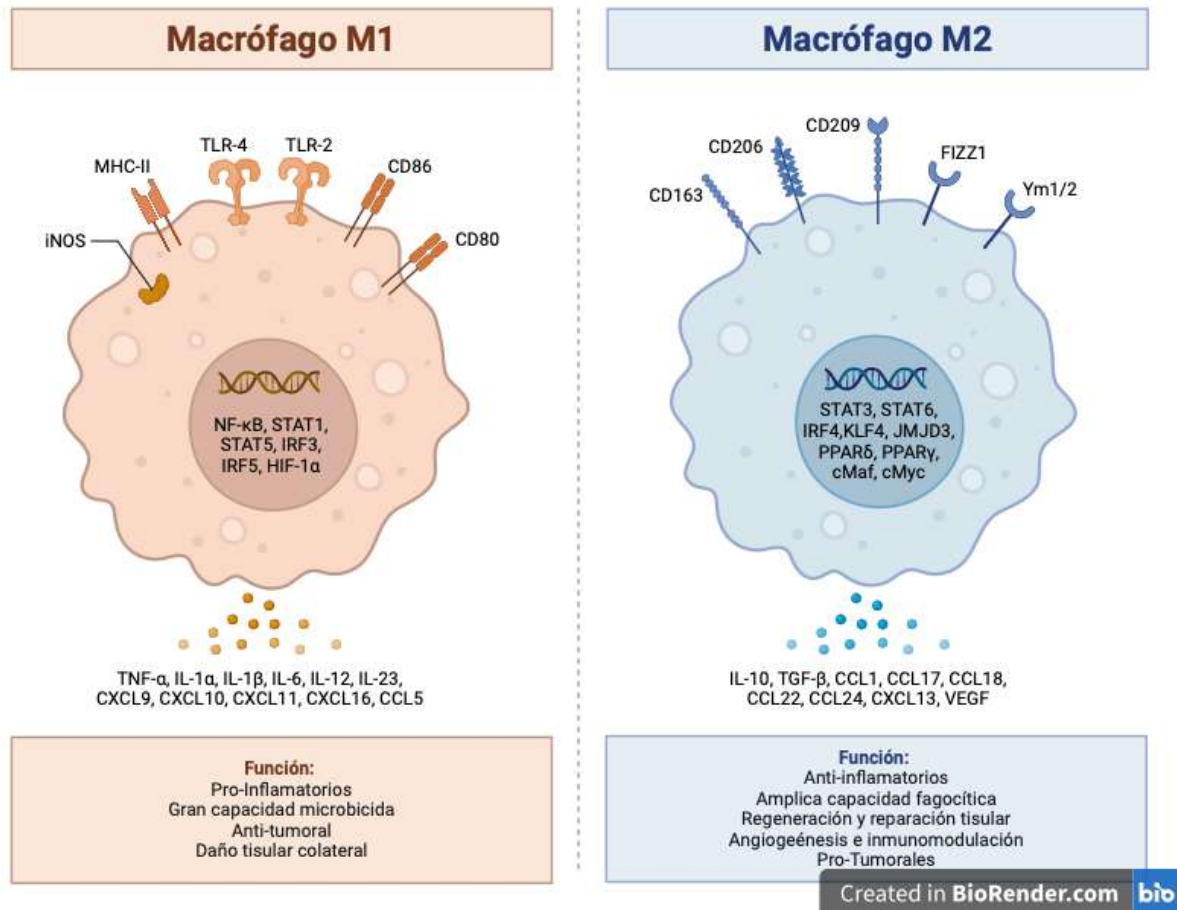


Figura 7. Fenotipos de macrófagos. Características fenotípicas generales de los macrófagos M1 y M2. **Basado en:** (71) **Creado en:** www.BioRender.com

Macrófagos M1

Los macrófagos activados clásicamente son diferenciados en respuesta al IFN γ vía STAT1 en combinación con ligandos de sus TLRs, denominándose macrófagos M1. Estas células son prototípicamente células inmunes efectoras, las cuales pueden eliminar patógenos intracelulares, como vimos previamente mediante la producción de ROS y RNS, así como también aumentar su capacidad de APCs facilitando el procesamiento antigénico y su cargado en moléculas de MHCII. Estas células también secretan un verdadero arsenal de citoquinas inflamatorias, que ayudan a orquestar y amplificar las respuestas inmunes Th1 y Th17. Como mecanismo regulador de retroalimentación negativa, la IL-10 induce la desactivación de los macrófagos vía

STAT3 y favorece un perfil tolerogénico articular. En presencia de IFN γ , la IL-10 es menos efectiva en suprimir la producción de citoquinas y quimioquinas, y en disminuir la expresión de MHC-II.

Así como fue evidenciado en los monocitos atípicos, en AR, el proceso inflamatorio sistémico y local es mediado y sostenido por macrófagos M1 tanto en la sangre periférica como en el tejido sinovial respectivamente. De modo similar a estos monocitos, los macrófagos M1 son claramente proinflamatorios caracterizadas por una alta expresión de MHCII, CD80, CD86, CD38 y TLR4, así como por la secreción de IL-1 β , IL-6 y TNF α , y quimioquinas como CCR7 (72).

La polarización a este fenotipo puede ser inducida por varios estímulos proinflamatorios, incluida la activación de la expresión del factor regulador de interferón 5 (IRF5) (73). La regulación positiva de IRF5 activa vías de señalización intracelulares que inducen la transcripción de varias subunidades de IL-12 y la represión de IL-10, promoviendo así la diferenciación de linfocitos Th1 (73).

TNF α , IL-1 β e IL-6 también promueven la activación de las vías de señalización MAPK mediante la fosforilación de ERK1/2, JNK y la quinasa p38 en células sinoviales derivadas de pacientes con AR crónica (74). Este proceso contribuye a la perpetuación de la inflamación y al daño articular característico de la enfermedad.

En el contexto de las actividades biológicas heterogéneas de los macrófagos, recientemente se identificó un subgrupo interesante denominado macrófagos osteoclastogénicos asociados a la artritis en el líquido y tejido sinovial de pacientes con AR. Junto con su capacidad para diferenciarse en osteoclastos, son muy eficientes en la activación de linfocitos T CD4⁺ productores de TNF α , contribuyendo a la amplificación de la inflamación y la destrucción ósea (75).

Estos macrófagos también se identificaron en un modelo murino de artritis inducida por colágeno (CIA), donde su diferenciación en osteoclastos parece estar mediada por la activación de las vías de señalización de RANKL y estimulada adicionalmente por TNF α . Este proceso involucra la activación del factor de transcripción Forkhead box M1, cuya inhibición bloquea la diferenciación en osteoclastos, atenuando la producción de citoquinas inflamatorias en el sinovio y reduciendo la erosión ósea articular (76).

Durante la inflamación articular producida en la AR, la formación del “pannus” sinovial y la presencia de un entorno inflamatorio hipóxico incrementan drásticamente la actividad glucolítica y fagocítica en los macrófagos. De hecho, las células M1, más que otras poblaciones celulares presentes comúnmente en los tejidos inflamatorios sinoviales en este contexto hipóxico, son responsables del daño al cartílago (77).

Macrófagos M2

Una segunda población de macrófagos activados, llamados macrófagos activados alternativamente o M2, surgen en respuesta a citoquinas producidas por las células Th2 como la IL-4 y/o IL-13. Estas células son funcional y bioquímicamente diferentes a las activadas clásicamente. No producen niveles elevados de ROS y RNS, pero sobreexpresan el receptor de manosa. Poseen una potente actividad inhibitoria de la actividad de los linfocitos T [\(78\)](#). Análisis de microarrays revelaron que la expresión del receptor de manosa, Relm-/Fizz1, arginasa 1, Ym1, así como el ligando inhibitorio PD-L2 se induce por la IL-4, y por lo tanto sirven como marcadores para identificar y aislar los macrófagos activados alternativamente de los tejidos (Figura 5). Estos macrófagos tienen un rol esencial en el proceso de reparación tisular fomentando la síntesis de matriz extracelular y la degradación de componentes pro-inflamatorios locales. Colaboran directamente con los fibroblastos sinoviales para el mantenimiento de la homeostasis articular [\(71\)](#). Además, la IL-10 y el TGFβ son moléculas producidas basalmente por los macrófagos M2, que redirigen la activación inmunitaria hacia un patrón de reparación tisular [\(78\)](#). El CD163 es un receptor colector de hemoglobina, soluble o unido a la membrana, altamente expresado en los macrófagos tisulares residentes, que contribuye a la respuesta anti-inflamatoria local al reducir los niveles de hemoglobina y promover metabolitos hemáticos que resuelven la inflamación como veremos más adelante [\(79\)](#), [\(80\)](#).

Esta dicotomía también se ve a nivel de monocitos, como mencionamos, los monocitos con *preset* inflamatorio, suelen ser los intermedios, cuyo fenotipo tiende a ser M1-like en contraste con los M2-like o no clásicos [\(77\)](#).

Terapias dirigidas específicamente a monocitos-macrófagos

Entre otros factores y citoquinas, se ha generado interés en el bloqueo del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos: GM-CSF. Este factor es un potente estimulador de los macrófagos y neutrófilos, y es producido constitutivamente por los macrófagos sinoviales en la sinovia de pacientes con AR, así como por fibroblastos tras su activación [\(81\)](#). Los ensayos clínicos han confirmado que bloquear el GM-CSF con anticuerpos monoclonales disminuye la actividad de la enfermedad en pacientes con AR [\(82\)](#), [\(83\)](#).

Focalizar la terapia en quimioquinas para monocitos en AR podría representar un potencial beneficio, evitando el ingreso de monocitos intermedios a la cavidad sinovial, de hecho, fueron terapias propuestas hace más de treinta años. Diversos intentos han mostrado beneficio preclínico incluyendo anticuerpos anti-quimioquinas o antagonistas de receptores de quimioquinas, pero pocos han tenido éxito en su pasaje a estudios Fase I o II en humanos. Este fracaso se debe principalmente a la

naturaleza redundante del sistema de quimioquinas, lo que dificulta bloquear el reclutamiento celular al dirigirse únicamente a una quimioquina o receptor específico. Las quimiocinas, como CXCL8 y CXCL5, están involucradas en la mejora de la trans migración de leucocitos (83), (84). La CCL2 también se ha implicado como un factor clave que recluta monocitos hacia la sinovia de pacientes con AR, pero su bloqueo no ha demostrado beneficio (85).

Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en AR

En su función habitual, los fagocitos activados producen ROS y RNS principalmente derivadas del óxido nítrico con actividad antimicrobiana y proinflamatoria potente. Esto responde al estallido respiratorio que da como resultado el rápido ensamblaje y activación de la NADPH oxidasa (NOX), que oxida NADPH y en el proceso reduce O_2 a anión superóxido (86). Esta enzima es un complejo enzimático que consiste en al menos siete proteínas (gp91, gp22, p40, p47, p67, Rac2) (86). La proteína citosólica es traslocada a la membrana fagosomal donde se forma el complejo enzimático activo. Por tanto, los ROS son producidos dentro del lisosoma protegiendo de este modo el resto de la célula. El anión superóxido es un producto intermediario reactivo del oxígeno que es tóxico para los microorganismos ingeridos. También genera otros agentes oxidantes potentes, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno (por dismutación espontánea). El H_2O_2 no es capaz de matar eficientemente por sí mismo, dado su rápida capacidad de atravesar las membranas, pero si es capaz de reaccionar rápidamente para formar compuestos tóxicos fuera del fagosoma.

El óxido nítrico se produce a partir de la arginina por acción de la óxido nítrico sintasa (NOS) y también participa en la eliminación de los patógenos y la inflamación. Existen diversos subtipos de NOS, siendo clave en este proceso la isoforma inducible, iNOS. Además las RNS y las ROS actúan de forma complementaria, donde el óxido nítrico reacciona con el superóxido para generar el radical peroxinitrito altamente reactivo (87). Este radical ataca y daña lípidos, proteínas y ácidos nucleicos presentes en los patógenos y también en el hospedero.

En las articulaciones inflamadas, los niveles de oxígeno disminuyen rápidamente, mientras que se produce un aumento del factor 1 α inducido por hipoxia (HIF1 α) y de ROS, seguido de la activación de genes inflamatorios como IL-1 β e IL-6, lo que promueve un daño tisular oxidativo masivo (88).

Los macrófagos M1, polarizados en respuesta al entorno inflamatorio, producen grandes cantidades de ROS y citoquinas proinflamatorias que exacerban la inflamación sinovial y el daño tisular. Por el contrario, los macrófagos M2 están más involucrados en la resolución de la inflamación y la reparación de tejidos. El equilibrio entre estos dos fenotipos de macrófagos es crucial para el manejo de la inflamación

crónica y la destrucción tisular, proceso en el cual las ROS y las RNS tienen un rol transversal.

La ornitina y el óxido nítrico son las moléculas más características de la polarización de los macrófagos hacia los estados activos M1 o M2, respectivamente. Ambas moléculas son metabolitos obtenidos a través de la escisión de la L-arginina. La ornitina promueve la proliferación celular, la cicatrización tisular y la fibrosis mediante la deposición de poliaminas y colágeno. Por otro lado, el óxido nítrico inhibe la proliferación celular y eleva los niveles de IL-12 e IL-18 [\(89\)](#).

Por otro lado, también se ha demostrado que las ROS y las mitocondrias dañadas también pueden promover la activación de diversas vías inflamatorias, como el inflammasoma NLRP3.

Además de los macrófagos sinoviales, también participan en la inflamación sinovial en AR los fibroblastos sinoviales similares a células (FLS), que están altamente activados y producen una gran cantidad de factores proinflamatorios, quimioquinas y factores de crecimiento [\(90\)](#).

El ambiente hipóxico de la inflamación sinovial aumenta la diferenciación de monocitos hacia osteoclastos y eleva la actividad osteoclástica [\(91\)](#). Además, las ROS afectan el ciclo de vida de los condrocitos y el metabolismo de la matriz cartilaginosa, contribuyendo a la progresión del daño al cartílago [\(92\)](#). Las ROS actúan como segundos mensajeros, activando vías como MAPK o NF- κ B, que median la producción de GM-CSF [\(93\)](#). Estos factores, a su vez, interactúan con el RANKL y el factor estimulante de colonias de macrófagos M-CSF para promover la diferenciación de los osteoclastos [\(94\)](#). Además, las ROS inducen la inactivación de SHP-1 mediante su unión a c-Src, promoviendo la supervivencia de los osteoclastos y aumentando la pérdida ósea [\(95\)](#).

Asimismo, las ROS influyen en la polarización de los macrófagos. La acumulación de ROS y la regulación positiva de HIF-1 α contribuyen a la polarización hacia el fenotipo M1, que genera respuestas inflamatorias. Por el contrario, la inhibición de HIF-1 α facilita la polarización hacia el fenotipo M2, que es antiinflamatorio [\(96\)](#).

Las ROS también actúan como intermediarios de señalización, interfiriendo en la síntesis de la matriz extracelular y aumentando la producción de metaloproteinasas de matriz, como MMP-1 y MMP-13, que degradan el colágeno del cartílago [\(97\)](#).

Finalmente, terapias dirigidas a la modulación de macrófagos están emergiendo como un área prometedora en la AR. Por ejemplo, nanopartículas diseñadas para

eliminar ROS y promover la repolarización de macrófagos hacia un fenotipo M2 antiinflamatorio han mostrado resultados prometedores en estudios preclínicos, reduciendo la inflamación articular y promoviendo la reparación tisular [\(98\)](#).

Hemoxygenasa: mediador antiinflamatorio de procesos crónicos

Al momento de trabajar con moléculas claves en el proceso oxidación-reducción asociadas al metabolismo de las ROS y las RNS es importante tener un contrabalance con un eje que regule negativamente este proceso proinflamatorio. Para ellos y por los antecedentes de nuestro grupo de investigación, seleccionamos el eje de la Hemo-oxigenasa 1 (HO-1).

La HO-1 es una enzima clave en el metabolismo del hemo, un componente de la hemoglobina [\(99\)](#). Esta enzima cataliza la degradación del hemo en tres productos principales:

- **Biliverdina**, que se convierte en bilirrubina (un potente antioxidante).
- **Monóxido de carbono**, que tiene propiedades antiinflamatorias y citoprotectoras.
- **Iones de hierro**, que se secuestran mediante la ferritina para evitar toxicidad.

La HO-1 es una proteína inducible, lo que significa que su expresión aumenta en respuesta a diversos estímulos como estrés oxidativo, metales pesados, citoquinas proinflamatorias, hipoxia y lípidos oxidados [\(99\)](#).

La expresión y regulación de varios genes citoprotectores ocurre principalmente a través de la vía Keap1/Nrf2. Los genes citoprotectores incluyen genes antioxidantes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de moléculas y proteínas que contrarrestan el estallido oxidativo. Uno de los genes principales regulados por Nrf2 es el de la HO-1 [\(100\)](#).

Nrf2, junto con la HO-1, tiene un efecto sinérgico que previene la amplificación de los mediadores inflamatorios, un proceso clave que contrarresta el desarrollo de la inflamación asociada a la AR [\(101\)](#), [\(102\)](#).

Los niveles atenuados y la producción de HO-1 pueden observarse en el tratamiento de inflamaciones severas de huesos, articulaciones, cartílagos y células, junto con la prevención de lesiones tisulares causadas principalmente por el estrés oxidativo en la AR [\(103\)](#), [\(104\)](#). Por lo tanto, su activación puede modular y conducir a la expresión de la inmunidad innata [\(105\)](#).

En las últimas décadas, la inducción del eje cuyo factor antiinflamatorio principal es la HO-1 ha sido destacado por su posible rol terapéutico para enfermedades con patogenia autoinmunitaria [\(106\)](#).

Hipótesis

La AR induce un estado inflamatorio sistémico, caracterizado por un aumento de monocitos circulantes y macrófagos tisulares de fenotipo proinflamatorio (M1) productores de ROS vinculado a un agravamiento de la actividad de la enfermedad.

Objetivos

Objetivo general: Estudiar la respuesta inflamatoria asociada a la AR, a nivel sistémico y articular, mediante el estudio de monocitos y macrófagos, la producción de ROS y la expresión de HO-1, tanto en un modelo experimental murino, como clínico en pacientes con AR enfatizando en su vínculo con la actividad de la enfermedad.

Objetivos específicos:

1. Poner a punto un modelo murino de Artritis Inducida por Colágeno (CIA) describiendo la respuesta inmune inflamatoria asociada.
2. Caracterizar las poblaciones celulares monocitarias circulantes y macrofágicas sinoviales en el modelo murino de CIA.
3. Esclarecer el rol de las ROS en el desarrollo y la actividad de artritis del modelo murino de CIA utilizando la cepa GP91^{phox} K.O (B6.129S-Cybbtn1Din/J) caracterizando sus aspectos proinflamatorios clínicos y humorales.
4. Describir la población de pacientes en estudio incluyendo datos demográficos, posibles variables confusoras y aspectos relevantes de la enfermedad.
5. Determinar y correlacionar variables proinflamatorias humorales y celulares como la producción de ROS en pacientes con AR vinculando las mismas con la actividad de la enfermedad.

Metodología

Organización metodológica general

De forma conceptual, la metodología del trabajo es organizada en dos módulos: un módulo básico basado en un modelo murino de CIA y un módulo clínico en el que se analizaron muestras de pacientes con artritis reumatoidea.

El módulo básico se desarrolló en el “Laboratorio de Inmunomodulación y Vacunas” (LIMV) perteneciente a la Unidad Académica de Inmunobiología, ubicado en Facultad de Medicina, dirigido por la Prof. Agda. Dra. Teresa Freire.

De forma práctica y cronológica se describe en primer lugar la metodología del módulo básico para posteriormente abordar la metodología del módulo clínico. Para armonizar su lectura, se vinculan con el orden de presentación de los resultados.

Estudio en muestras provenientes de ratones con artritis

Modelo murino de CIA

Para caracterizar aspectos clínicos, celulares y humorales se puso a punto un modelo de inmunización murina de artritis. Se utilizaron ratones machos C57BL/6 inducidos según el “Protocol for the successful induction of Collagen Induced Arthritis (CIA) in Mice” proporcionado por Chondrex, Inc. Brevemente, los ratones fueron inyectados por vía subcutánea en la cola con 200 µg de Colágeno de tipo II proveniente de gallina en emulsión con Adyuvante de Freund Completo (CFA) al día 0, realizando complementariamente un booster al día 21, el protocolo detallado para la emulsión se detalla a continuación:

1. Preparar el Homogenizador T50 Ultraturrax (IKA Germany) colocando la cuchilla de 0.5 mm dentro del portacuchillas mediano, acomodando el soporte y ajustando la altura para trabajar dentro de una hielera.
2. Verificar el funcionamiento y la velocidad.
3. Colocar 2.5 mL de CFA y agregarlo en un tubo apropiado para trabajar y colocarlo en la hielera.
4. Tomar 2.5 mL de colágeno tipo II de gallina a 2 mg/mL y colocarlos en un tubo de vidrio en la hielera. *De necesitar otros volúmenes mantener siempre la relación 1:1.*
5. Pipetear con la p200, 200 µL de colágeno.
6. Homogeneizar a velocidad baja (1/6) hasta terminar de agregar el colágeno gota a gota al tubo que contiene el CFA (aproximadamente 15 minutos). Es conveniente subir y bajar la cuchilla dentro del tubo así como realizar movimientos circulares.

7. Dejar reposar en hielo por 5 minutos .
8. Homogeneizar a velocidad máxima (6/6) por 2 minutos, teniendo la mismas consideraciones que el punto 6.
9. Dejar reposar por 5 minutos.
10. Repetir los pasos 8 y 9 dos veces más alcanzando un total de 3 ciclos.
11. Verificar la estabilidad colocando una pequeña gota de 10 µL en un vaso de bohemia con agua verificando que mantenga la integridad por aproximadamente 10 minutos.
12. Mantener la emulsión en hielo hasta su uso.

En este modelo los signos clínicos de la enfermedad se hacen evidentes entre la 4ª y 5ª semana. Como sugerido en el protocolo de Chondrex. Inc, se evaluaron los signos clínicos de artritis, según la hinchazón, rubicundez y rigidez articular de las patas, con una escala de puntaje definida a continuación en la [Tabla 1](#).

Tabla 1. Score clínico de artritis

Score	Manifestaciones Clínicas
0	Normal
I	Leve rubor y edema de carpo o tarso definido, o rubor y edema limitado a algunos dedos individuales, independientemente del número de dedos
II	Moderado rubor y edema de carpo o tarso
III	Severo rubor y edema de la totalidad de la pata incluyendo dedos
IV	Máxima inflamación del miembro que involucra múltiples articulaciones

Asimismo, se analizó el espesor (edema) de tobillos y muñecas para cada ratón mediante el uso de microcalibres desde el momento de la inducción, el diámetro se expresó como el promedio de las cuatro patas por animal en relación al peso individual dada la disparidad de peso entre los casos y los controles. Las variables fácilmente analizables corresponden al promedio total de los cuatro miembros y a la suma de los scores para cada miembro (Score Total).

El protocolo N°1074 ([Anexo 2](#)) para la experimentación animal se encuentra aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Medicina tomando el consejo de nuestra institución conocimiento respecto a la aprobación ([Anexo 3](#)). La manipulación, cuidado y experimentación fue realizada en su totalidad según las normas institucionales y regulación de la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA) en la Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación

(URBE), con temperatura controlada entre 19 y 21 °C, ciclos de luz de 14 horas y 10 de oscuridad. Los animales fueron alojados en cajas pequeñas y medianas posterior a su randomización, en su totalidad recibieron aire filtrado, agua y ración estéril *ad libitum*. Se utilizaron en total 6 tandas de ratones con un número promedio de 32 animales en total, destinando una relación inicial entre casos y controles de 5-6/1. No fue realizado un cálculo de *n a priori* dado que se trataba de una puesta a punto. El *n* fue variable dependiendo de la mortalidad asociada al modelo, por este motivo se especifican cuando los puntos de las gráficas representan un ratón individual o un pool de muestras.

Destacamos que la primera tanda de ratones se centró en evaluar las variables determinadas por el protocolo de Chondrex, sugiriendo probar ratones de diferente edad, que incluyera ratones hembras, diferentes sitios de punción y variaciones en la concentración de adyuvante así como un posible tercer booster. De todas estas variables la única modificada finalmente del protocolo inicial fue el adyuvante utilizado en el booster, que contiene una menor concentración de partícula de *M. tuberculosis*.

Eutanasia

Dada la elevada severidad del modelo, los ratones que cumplieron con los criterios de punto final especificados a continuación fueron sacrificados: pérdida de peso > al 20% del peso inicial, signos de artritis severa que impidan un aceptable desplazamiento, claros signos de dolor persistentes, conductas erráticas, ulceración de sitio de inyección, sobreinfección bacteriana. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical a un tiempo final de aproximadamente 10-12 semanas posterior a la primera inmunización.

Comparación de variables clínicas

A modo de comparar si las variables clínicas entre ambos grupos fueron diferentes, se realizó un test de homogeneidad de pendientes realizando la regresión lineal para cada grupo y comparándolas entre sí, evaluando la cinética en su conjunto.

Correlaciones iniciales

A modo de obtener una validación inicial entre el *Score* clínico (medida francamente subjetiva) y el promedio del diámetro articular (medida con microcalibre digital) se buscó la correlación entre un parámetro inflamatorio clínico (*Score* de actividad) con un parámetro inflamatorio plasmático inespecífico (PCR).

Es importante destacar para todas las correlaciones tres aspectos relevantes:

1. El **valor p** en una **correlación** mide la significancia estadística de la relación entre dos variables. Específicamente, indica si la correlación observada entre las variables es lo suficientemente fuerte como para concluir que no se debe al azar.
2. El **coeficiente de correlación de Pearson**, representado por r , mide la fuerza y dirección de la relación lineal entre dos variables. Su valor puede variar entre -1 y 1, donde un valor de $r = 1$ indica una correlación perfecta positiva, es decir, a medida que una variable aumenta, la otra también lo hace de manera proporcional. En contraste, un $r = -1$ indica una correlación perfecta negativa, lo que significa que cuando una variable aumenta, la otra disminuye. Si $r = 0$, no existe correlación lineal entre las variables, lo que sugiere que no hay una relación evidente entre ambas. Un valor de r más cercano a 1 o -1 indica una relación más fuerte, mientras que valores cercanos a 0 muestran una relación débil o inexistente.
3. Por otro lado, **R^2 (coeficiente de determinación)** es una medida del ajuste del modelo en una regresión lineal. Varía entre 0 y 1, donde un valor de $R^2 = 1$ significa que el modelo de regresión explica el 100% de la variación en la variable dependiente (Y) a partir de la variable independiente (X), mientras que $R^2 = 0$ indica que el modelo no explica nada de dicha variación. En resumen, R^2 muestra qué proporción de la varianza en Y puede ser atribuida a X, es decir, qué tan bien los datos se ajustan al modelo.

Proteína C Reactiva

A modo de determinar un parámetro sérico inflamatorio inespecífico se realizó la cuantificación de la PCR en suero para ambos grupos de ratones utilizando el “Dimension RxL Max integrated chemistry system; Siemens” el cual realiza de manera automática el muestreo, la dispensación de reactivos, la mezcla, la separación, el procesamiento y la impresión de resultados. Partículas sintéticas recubiertas con anticuerpos para la PCR se agregan en presencia de la PCR en la muestra. El aumento de la turbidez que acompaña a la agregación es proporcional a la concentración de PCR en mg/mL por turbidimetría.

Evaluación respuesta inmune humoral adaptativa

La sangre recolectada a partir de punción de vena mandibular, posterior a la separación de 50 μ L para la realización del hemograma, fue centrifugada por 15 minutos a 5000 rpm para obtener el plasma. En primer lugar determinamos el valor en UI de anticuerpos IgG2a específicos para colágeno tipo II de gallina en suero de ratones inmunizados mediante un ELISA Indirecto según el protocolo establecido por Chondrex detallado brevemente a continuación:

Primero, se sensibilizaron placas Nunc de 96 pocillos con 50 μ L de colágeno tipo II de gallina a una concentración de 5 μ g/mL, diluido en buffer carbonato 50 mM pH 9.6, y se incubaron toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0.1% . A continuación, se bloqueó cada pocillo con 100 μ L de gelatina al 1% en PBS, incubando por 1 hora a 37 °C. Tras el bloqueo, se realizaron tres lavados adicionales con PBS-Tween 0.1%.

Se colocaron 50 μ L de plasma murino en dos diluciones, 1/50 y 1/100, preparadas en gelatina al 1% en PBS-Tween 0.05% (PTG), y cada muestra se dispuso en triplicado. Además, se preparó una curva de calibración utilizando el anticuerpo estándar IgG2a (Chondrex. Cat. N° 2037) diluido en PTG, partiendo de una concentración inicial de 5000 UI. Tanto el plasma murino como la curva de calibración se incubaron por 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0.1%.

Luego, se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG2a conjugado a peroxidasa, diluido 1/1000 en PTG, y se incubó por 1 hora a 37 °C. Después, se efectuaron cinco lavados con PBS-Tween 0.1%.

Para revelar, se colocaron 200 μ L de una solución de o-Penilendiamina dihidrocloruro (OPD) (0,5 mg/mL) con H₂O₂ al 0,12% en buffer citrato-fosfato 0.1 M pH 5, deteniendo la reacción con 25 μ L de HCl 3 M. Finalmente, se midió la absorbancia a 492 nm y se calcularon las UI de anticuerpos.

En segundo lugar se determinaron los títulos de anticuerpos con especificidad para colágeno II de gallina inicialmente para anticuerpos totales sin determinar isotipo, para posteriormente analizar el título de IgM, IgG totales e IgG1 utilizando un diseño de ELISA indirecto de forma análoga al previamente mencionado pero con anticuerpos secundarios para cada situación descritos a continuación:

IgG Totales - SIGMA Biotin Conjugated Cat N° A-4416 Goat anti-mouse

IgG1 - SIGMA Biotin Conjugated Cat N° SAB-3701171 Goat anti-mouse

IgM - SIGMA Biotin Conjugated Cat N° B-9265 Goat anti-mouse

Ac. Totales - SIGMA Biotin Conjugated Cat N° A-3763 Goat anti-mouse

El *cut off* fue calculado inicialmente como la media del valor obtenido para el suero de los ratones controles + 3 desviaciones estándar (SD). En un análisis más exigente de los datos fue determinado como la media del valor de los controles *2.

Posteriormente se evaluó la correlación entre el Score de Actividad Total y los títulos de Anticuerpos contra colágeno de tipo II de gallina y los títulos del isotipo patológico más relevante IgG2a.

Determinación de anticuerpos en líquido articular

La presencia de anticuerpos específicos contra colágeno de tipo II de gallina en líquido articular (obtenido según protocolo detallado más adelante) en los ratones que desarrollaron clínicamente artritis se determinó utilizando el mismo diseño experimental explicado anteriormente.

Evaluación macroscópica ganglionar

A modo de obtener una evaluación inicial de la respuesta inmune adaptativa, determinamos el tamaño de los ganglios linfáticos drenantes inguinales, siendo este el primer repel anatómico de la cadena ganglionar observable a simple vista durante la disección. La comparación macroscópica fue realizada a través del análisis con el software ImageJ®.

Validación de fenotipo de respuesta inmune adaptativa

Para el estudio de la polarización de linfocitos T hacia una respuesta Th1 se realizó una proliferación celular de células de ganglio drenante con un estímulo policlonal. Se obtuvieron suspensiones celulares de los ganglios inguinales por disgregación mecánica con laminillas de vidrio esterilizadas a modo de obtener una suspensión celular en medio de cultivo. Se realizaron lavados seriados con PBS culminando en la centrifugación (ST16R Thermo Scientific) a 1500 rpm por 5 minutos. Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer a modo de realizar las cuentas correspondientes para cultivar 1×10^6 células en RPMI completo en presencia de estímulos policlonales (anti-CD3 1/500 y anti-CD28 1/250 (1 µg/ml) por 72 horas a 37°C con CO₂ 5%. Además se cultivó en medio con Colágeno de tipo II de gallina diluido a 20ug/mL.

Posteriormente se determinó la concentración de IFN γ en los sobrenadantes de cultivo mediante un ELISA sandwich siguiendo el siguiente protocolo:

Primero, se sensibilizaron placas Nunc de 96 pocillos con 50 µL por pocillo de un anticuerpo primario específico para IFN γ (BD Cat N° 551309), diluido en buffer fosfato 100 mM pH 9, y se incubaron overnight a 4 °C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0.1%. A continuación, se bloqueó con 100 µL de gelatina al 1% en PBS, incubando por 1 hora a 37 °C. Tras el bloqueo, se efectuaron otros tres lavados con PBS-Tween 0.1%.

Luego, se colocó el sobrenadante de cultivo sin diluir junto con las diluciones del estándar de IFN γ para la curva de calibración, incubando por 1 hora a 37 °C. Nuevamente, se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0.1%.

Se añadió el anticuerpo secundario anti-IFN γ conjugado a peroxidasa (BD Cat N° 551506), diluido en PTG, y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se realizaron cinco lavados adicionales con PBS-Tween 0.1%.

Para revelar, se añadieron 200 μ L de una solución de OPD (0,5 mg/mL) y H₂O₂ al 0,12% en buffer citrato-fosfato 0,1 M pH 5. La reacción se detuvo con 25 μ L de HCl 3 M. Finalmente, se midió la absorbancia a 492 nm y se calcularon los títulos de los anticuerpos.

Evaluación de respuesta inmune inflamatoria en plasma

Para evaluar la respuesta inmune inflamatoria se realizaron una serie de ELISAs sandwich específicos para diferentes citoquinas proinflamatorias, del mismo modo que fue enunciado anteriormente para IFN γ . Los anticuerpos, sus diluciones y números de catálogo se encuentran en la [Tabla 2](#) a continuación.

Tabla 2. Anticuerpos para citoquinas murinas

Citoquina	Anticuerpo de captura	N° catálogo de	Anticuerpo de detección	N° catálogo de
IL - 1 β Bioscience	0.5 mg/ml	503502	0.5 mg/ml	515801
IL - 2	0.5mg/ml	554424	0.5mg/ml	554426
IL - 6	0.5 mg/ml	554400	0.5mg/ml	554402
IL - 12 p70 BDF	1.0 mg/ml	551219	0.5mg/ml	554658
TNF α eBioscience	0.5 mg/ml	14-7325-85	0.5 mg/ml	13-7326-85
IFN γ	0.5 mg/ml	551309	0.5 mg/ml	551506

Hemograma e índices

Para obtener un panorama general de las poblaciones celulares, se realizó un hemograma básico de sangre obtenida por punción de la vena mandibular, a modo de analizar las tres series, glóbulos rojos, plaquetas y los diferentes subtipos de leucocitos. Se utilizó un analizador hematológico automático (BC-5000 Vet, Mindray) realizado en colaboración con el Mág. Anderson Saravia de INIA “La Estanzuela”. Brevemente la sangre fue extraída de la vena mandibular, siendo recolectada en

tubos recubiertos internamente con una fina capa de citrato de sodio al 4%, manteniendo una relación 1/10. Las muestras fueron transportadas a 4° C hasta su análisis. Se evaluó la proporción Neutrófilo/Linfocito (NLR) y Monocito/Linfocito (MLR), tanto en número como en %.

Citometría de flujo para poblaciones celulares circulantes en sangre

A modo de evaluar la población de células mieloides en sangre, con un foco central en monocitos se realizó un ensayo de citometría de flujo a partir de sangre total. Se dispersaron 50 µL/well de sangre, con sus replicas correspondientes en base al número de muestra y marcadores de superficie o intracelulares a analizar. En primera instancia realizamos la marcación sin lisar glóbulos rojos, según protocolos establecidos, dado el bajo rendimiento de las primeras marcaciones en las puestas a punto es que decidimos realizar previo a la marcación la lisis de los glóbulos rojos con un buffer de lisis conteniendo 150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA agregando 100 µL de buffer y dejándolo actuar un minuto, para posteriormente agregar 100 µL de buffer FACS y centrifugar.

Para la detección de marcadores membranarios con anticuerpos específicos, luego de haber sido centrifugadas a 2000 RPM durante 5 minutos a 4 °C, se agregó en cada pocillo 50 µL de la mezcla de anticuerpos membranarios (detallados en la Tabla 3) en buffer FACS (2% de Suero Fetal Bovino (FBS) en PBS) y se incubó durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente se realizaron dos lavados con buffer FACS, se resuspendieron las células en 200 µL de buffer FACS y se analizaron con un citómetro de flujo Accuri C6 Plus (BD Biosciences).

Para la marcación de moléculas/proteínas intracelulares, se utilizaron los buffers de fijación y permeabilización de BioLegend, según su recomendación. Posterior a la marcación extracelular, se fijaron las células con el buffer de fijación por 20 min a temperatura ambiente. Luego se lavaron con el buffer de permeabilización diluido en agua destilada y se incubaron las células con los anticuerpos intracelulares diluidos en buffer de permeabilización por 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Luego se realizaron dos lavados con buffer FACS, se resuspendieron las células en 200 µL de buffer FACS y se adquirieron utilizando un citómetro de flujo Accuri C6 Plus (BD Biosciences).

Tabla 3. Diseño de mixes para FACS sangre (modelo murino).

	Mix 1	Mix 2	Mix 3
FL1 - FITC	ROS (Sonda DHR123)	HO-1 (Alexa Fluor 647)	CD11b (M1/70)

FL2 - PE	F4/80 (BM8)	CD68 (FA-11)	Ly6G (IA8)
FL3 - PercP	Ly6C (HK1.4)	Ly6C (HK1.4)	Ly6C (HK1.4)
APC	CD11b (M1/70)	CD11b (M1/70)	MHC II (M5/114.15.2)

Blanco detectable por el anticuerpo (n° de clon)

Para el diseño de las mix fue tomado en cuenta el siguiente diagrama de la [Tabla 4](#):

Tabla 4. BD Accuri™ C6 - BD Biosciences Láser y Fluoróforos recomendados.

BD Accuri™ C6 - BD Biosciences				
Láser	Detector	Filtros (nm)	Rango del filtro (nm)	Fluoróforos más comunes
488 nm	FL1	533/30	518- 548	FITC, BD Horizon Brilliant Blue 515, Alexa Fluor® 488, CFSE, GFP, YFP
	FL2	585/40	565-605	PE, PI, PE-CF594, Naranja de acridina
	FL3	670 LP	> 670	PerCP, PE-Cy5, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, PI, 7-AAD
640 nm	FL4	675/25	663-688	APC, APC-Cy5, Alexa Fluor® 647

Como se evidencia en la [Tabla 5](#), a modo de control de calidad, se realizaron los siguientes controles “*Fluorescence minus one*” (FMO) para cada una de las mezclas con 4 anticuerpos. Un ejemplo de lo realizado se encuentra en el [Anexo 9](#).

Tabla 5. Diseño general para una Mix de anticuerpos de FACS.

	Mix	FMO-1	FMO-2	FMO-3	FMO-4	SM
Anticuerpo 1	X		X	X	X	
Anticuerpo 2	X	X		X	X	
Anticuerpo 3	X	X	X		X	
Anticuerpo 4	X	X	X	X		

Los datos fueron analizados en el software proporcionado por BD Biosciences para el Accuri C6.

Merece especial mención la sonda Dihydrorhodamine 123 (DHR123) para la detección de ROS intracelulares, donde las células fueron incubadas con DHR123 diluida en PBS por 30 minutos a 37 °C.

La marcación para HO-1 se realizó mediante conjugación del anticuerpo específico (clon ab-13248, Abcam, Waltham, MA, USA) con un fluoróforo, seguida de un proceso de diálisis para eliminar el fluoróforo no conjugado.

Citometría de flujo para poblaciones celulares articulares

Para la obtención de células articulares, se puso a punto la obtención de la mismas según un protocolo previo ya establecido tomado como referencia [\(107\)](#) . Brevemente se describen los pasos a continuación:

Primero, se esterilizó el ratón utilizando etanol al 70%. A continuación, se obtuvo la articulación de tobillo y muñeca mediante disección precisa con tijera y pinza, eliminando la piel y descartando los dedos. Luego, se removieron el tejido muscular y las partes blandas sobrantes.

Para descartar células de médula ósea, se realizaron lavados utilizando un medio con enzimas de digestión que contenía hialuronidasa (2.4 mg/mL) y colagenasa VII (1 mg/mL) en RPMI con 10% FBS, aplicando jeringas de 1 mL con agujas de 27 G. Posteriormente, las articulaciones se colocaron en una placa descartable de 5 cm con medio de digestión.

Las articulaciones fueron seccionadas en pequeños fragmentos de aproximadamente 3-4 mm y se incubaron en agitación suave durante 1 hora a 37 °C. Después, se colocaron los fragmentos en un *strainer* de 70 um sobre un tubo de 50 mL, triturando los tejidos con el émbolo de una jeringa de 5-10 mL, teniendo cuidado de no romper el filtro.

El material resultante se lavó con 10 mL de medio completo y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, y finalmente, el pellet se resuspendió en buffer FACS.

El proceso de marcación de las células para citometría no presenta variaciones respecto a lo previamente mencionado. Se adjunta la [Tabla 6](#) con el diseño de las diferentes mezclas de anticuerpos y sonda DHR:

Tabla 6. Diseño de mixes para FACS articular (modelo murino).

	Mix 1	Mix 2	Mix 3
FL1 - FITC	ROS (DHR123)	HO-1 (Alexa Fluor 647)	F4/80 (BM8)
FL2 - PE	F4/80 (BM8)	F4/80 (BM8)	CD11b (M1/70)
FL3 - PercP	Ly6C (HK1.4)	IRF5 (MA123)	MHC II (M5/114/15.2)
APC	CD11b (M1/70)	IRF4 (MA120)	CD68 (FA-11)

Anticuerpo (nº de clon)

qRT-PCR para moléculas claves en el sistema oxidación-reducción

La extracción de ARN total de células ganglionares inguinales de ambos grupos de ratones fue realizada con Tri-Reagent (Merk, Kenilworth, NJ, USA) en base al protocolo previamente establecido. Las células fueron almacenadas en 500 μ L de Tri-reagent a -80 °C. Para su posterior procesamiento, las muestras fueron colocadas a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 125 μ L de cloroformo, se agitó en vórtex durante 15 segundos y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se dejó reposar durante 10 minutos y se centrifugó a 2400 rpm durante 15 minutos. Tras la centrifugación, se obtuvieron dos fases. La fase superior fue transferida a otro tubo Eppendorf y se añadieron 500 μ L de isopropanol por cada mililitro de Tri-Reagent utilizado. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó durante 10 minutos a 12,000 g a 4°C. El precipitado obtenido en esta etapa corresponde al ARN. El ARN fue lavado con 1 mL de etanol al 75% (preparado con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC), agitado en vórtex y centrifugado a 7500 g durante 5 minutos a 4°C. El precipitado se dejó secar y se resuspendió en 30 μ L de agua-DEPC previamente calentada a 55°C.

La cuantificación del ARN se realizó por espectroscopía, midiendo la absorbancia a 260 nm. La pureza del ARN extraído se determinó analizando la relación entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm. En el caso del ARN, esta relación debe ser mayor a 1.7. Las mediciones de cuantificación y pureza se realizaron en un equipo Nanodrop (Thermo Scientific).

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit SensiFAST cDNA Synthesis de Bioline. Primero, se preparó una mezcla de reacción que incluía el tampón TransAmp, la enzima Transcriptasa Inversa a 200 U/ μ L y 1 μ g de ARN, calculado de acuerdo con la concentración obtenida del Nanodrop. El cDNA se sintetizó en un termociclador T Gradient de la marca Biometra, utilizando el siguiente programa: 25°C durante 10 minutos, 42°C durante 15 minutos, 48°C durante 15 minutos, y 85°C durante 5 minutos.

La expresión génica de Nrf2, superóxido dismutasa (sod) 1 y 2, HO-1 y peroxirredoxina 1 fue detectada utilizando el sistema Eco real-time PCR (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.) y el kit Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, EE.UU.). Las condiciones estándar de amplificación fueron 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos térmicos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C, con una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Los resultados se expresaron como la relación entre la expresión de cada gen en estudio y la expresión de GAPDH. Los niveles de expresión génica relativa se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ y se normalizaron con GAPDH. La [Tabla 7](#) a continuación muestra los cebadores y las condiciones de Tm utilizadas.

Tabla 7. Genés y secuencias target para qRT-PCR.

Gen	Secuencia	Tm
mNrf2-F	5' - CAG CAT GGT ACG TGA TGA GG -3'	56.0 °C
mNrf2-R	5' - GCT CAG AAA AGG CTC CAT CC -3'	55.8 °C
mHO1-F	5' - CCT CTG ACG AAG TGA CGC C -3'	58.0 °C
mHO1-R	5' - CAG CCC CAC CAA GTT CAA A -3'	55.8 °C
mPrdx 1 -F	5'- ACA CCC AAG AAA CAA GGA GGA TT -3'	56.6 °C
mPrdx 1 -R	5'- CAA CGG GAA GAT CGT TTA TTG TTA -3'	53.3 °C
mSod 1 -F	5'- TGG GTT CCA CGT CCA TCA GTA -3'	58.0 °C
mSod 1 -R	5'- ACC GTC CTT TCC AGC AGT CA -3'	58.8 °C
mSod2 -F	5'- ATT AAC GCG CAG ATC ATG CA -3'	55.3 °C
mSod2 -R	5'- TGT CCC CCA CCA TTG AAC TT -3'	56.7 °C

Modelo GP91^{phox} K.O y CIA.

A modo de evaluar el rol de las ROS en el modelo de CIA murino, trabajamos con la cepa GP91^{phox} K.O (B6.129S-Cybbtm1Din/J) subunidad clave de la enzima NADPH oxidasa responsable de la formación de ROS en macrófagos y monocitos. Los mismos fueron adquiridos de Jackson Laboratory (USA) y mantenidos en URBE en las mismas condiciones previamente descritas.

Se realizó un ensayo *in vivo* utilizando esta cepa de ratones, divididos en dos grupos, aquellos correspondientes al modelo CIA y a sus respectivos controles, así como también inmunizamos del mismo modo una tanda de los ratones sin alteraciones genéticas específicas de modo que podemos determinar 4 grupos: GP91^{phox}K.O RA, GP91^{phox}K.O controles, Littermates (C57) RA, y Littermates controles (C57).

Para este modelo fue evaluado, el conteo celular mediante un hemograma básico, los índices NLR y MLR así como el análisis de citoquinas en plasma y el perfil de la

respuesta inmune células adaptativa de los ganglios inguinales mediante la medición de IFNg, fueron realizados como se se describió previamente.

Como único aspecto metodológico a diferenciar, para evaluar la avidéz de los anticuerpos IgG e IgM contra colágeno tipo 2 de gallina, se realizó un ensayo ELISA indirecto utilizando el plasma de los ratones inmunizados diluido a 1/50. En el procedimiento, se utilizó una solución de urea de 7 M en PBS como agente desnaturante para medir la estabilidad de la unión antígeno-anticuerpo. La avidéz se calculó como el cociente entre la absorbancia obtenida en presencia de urea y la absorbancia correspondiente en la misma dilución sin urea (con PBS), donde el valor de absorbancia con PBS se consideró como el 100% de la unión. Además, cada condición experimental incluyó un control blanco específico. Este método permite observar una disminución del coeficiente de avidéz a medida que aumenta la concentración de urea, interpretándose como mayor avidéz en los anticuerpos que presentan una menor disminución de absorbancia ante concentraciones crecientes de urea.

Módulo clínico

Pacientes

Se llevó a cabo un estudio descriptivo, observacional y transversal en el que se reclutaron 27 pacientes con diagnóstico de AR, quienes asistieron a la consulta ambulatoria en la Policlínica de EAS del HM durante el año 2022 bajo la tutoría de la Prof. Adj. Carolina Díaz. El proyecto fue presentado al Comité de Ética de Investigación del Hospital Maciel (Protocolo N.º 32) y obtuvo su aprobación ([Anexo 7](#)). Mediante una breve entrevista, se verificó que cada paciente cumpliera los criterios de inclusión. La población incluida fueron pacientes mayores de 18 años que aceptaron participar voluntariamente en la investigación, firmando el consentimiento informado, y cumplieran con los criterios clasificatorios de AR ([Anexo 4](#)).

Como grupo control, se enrolaron 29 controles voluntarios cuyo perfil demográfico y biológico fue comparable al de los pacientes que participaron en el estudio. Una vez identificados los pacientes y los controles, se solicitó la firma del consentimiento informado ([Anexo 4](#)), respondiendo las dudas planteadas y entregando una hoja informativa sobre el proyecto ([Anexo 5](#)). Se aseguró la correcta anonimización parcialmente reversible de los datos personales de acuerdo con el decreto 379/008, garantizando la confidencialidad y privacidad del participante y minimizando los riesgos morales asociados al manejo de sus datos.

Posteriormente, se realizó una breve entrevista en la que se completó un formulario diseñado por el equipo investigador para recolectar datos patronímicos y variables

relacionadas con la patología, tratamientos y posibles factores de confusión ([Anexo 6](#)). Para medir la actividad de la enfermedad, se emplearon los puntajes clínico-paraclínicos recomendados por organismos internacionales (ACR/EULAR), utilizando inicialmente el score CDAI debido a la demora en la obtención del resultado de la PCR plasmática, complementado posteriormente con el cálculo del DAS 28.

Se realizó la extracción de 10 cc de sangre mediante venopunción periférica, siguiendo el protocolo adecuado y ejecutada por personal capacitado. Las muestras de sangre se conservaron en frío para su traslado al laboratorio de la Unidad Académica de Inmunobiología de la Facultad de Medicina, donde fueron procesadas para los análisis detallados a continuación.

Se realizó un análisis no preplanificado a modo de determinar las variables principales del estudio en función de la actividad de la enfermedad, para lo cual se utilizaron los scores de actividad para dividir en cuatro subgrupos a los pacientes: en remisión, baja actividad, moderada actividad y alta actividad de la enfermedad.

Conteo celular básico

El conteo celular a través de un hemograma fue realizado del mismo modo que para la población murina, utilizando los ajustes para la especie previamente establecidos para el equipo. Los índices NLR y MLR fueron calculados del mismo modo. La determinación de la PCR en suero fue realizada con el mismo kit mencionado.

Evaluación de respuesta inflamatoria en plasma

Del mismo modo que en el modelo murino, se realizaron una serie de ELISAs sandwich para determinar diferentes citoquinas. A continuación en la [Tabla 8](#) se encuentra el resumen de los anticuerpos utilizados, sus diluciones y números de catálogo.

Tabla 8. Anticuerpos para detección de citoquinas (humanos)

Citoquina	Anticuerpo 1°	N° catálogo de	Anticuerpo 2° biotinilado	N° catálogo de
IL - 1 β	0.5mg/mL	508202	0.5mg/mL	508302
IL - 2	0.5mg/mL	500302	0.5mg/mL	517605
IL - 6	1mg/mL	554543	1mg/mL	554546
IL - 8	1mg/mL	554718	1mg/mL	554716

IL - 10	1mg/mL	551704	1mg/mL	551709
IL - 12 p70	0.5mg/mL	554660	0.5mg/mL	555065
TGF β	0.5mg/mL	525301	0.5mg/mL	527105
TNF α MAX tm	1mg/mL	B239783	1mg/mL	B239786

Purificación de PBMCs

A diferencia del modelo murino, para evaluar las células mieloides circulantes, purificamos en primera instancia los PBMCs a partir de sangre total tanto para los pacientes como para los controles. A continuación se detallan los pasos utilizados:

Primero, se centrifugó un tubo con sangre total heparinizada a 2300 rpm durante 20 minutos a 20 °C, con una aceleración de 9 y freno en 6. A continuación, se mantuvo la temperatura estable y, trabajando en una cabina de flujo laminar, se removió cuidadosamente el plasma, que se almacenó en tubos rotulados con fecha y número. Luego, se transfirió el *buffy coat* a un tubo Falcon de 15 mL y se completó con PBS estéril hasta alcanzar los 8 mL, homogeneizando mediante pipeteo. En otro tubo Falcon de 15 mL, se agregaron 6 mL de Ficoll-Hypaque (1.077 g/mL) y, con cuidado, se añadió la sangre diluida en PBS por la pared del tubo, evitando mezclar las fases.

La mezcla se centrifugó a 1500 rpm durante 30 minutos a 20 °C, con una aceleración de 9 y sin freno. Posteriormente, se recuperaron las PBMCs de la interfase con una micropipeta de 200 μ L, 1000 μ L o una pipeta Pasteur, transfiriéndolas a un tubo Falcon de 15 mL y llevándolas a un volumen de 14 mL con PBS estéril, manteniendo el tubo en hielo.

Seguidamente, se centrifugó a 1300 rpm durante 7 minutos a 20 °C, con aceleración de 9 y freno en 6. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron nuevamente en 14 mL de PBS. Finalmente, se repitió la centrifugación bajo las mismas condiciones y se mantuvo el tubo en hielo hasta su uso.

Posterior a la purificación de PBMCs los mismos fueron en primera instancia llevado a una concentración de 100000 cel/mL para posteriormente ser divididos en dos alícuotas diferentes, una para su marcación para FACS y otra para su cultivo frente a estímulos para posteriormente realizar la detección de citoquinas en el sobrenadante de cultivo para todas las condiciones y para su marcación para FACS.

Citometría de flujo para poblaciones celulares circulantes

A diferencia del modelo murino, previamente a la marcación para FACS, los PBMCs fueron estimulados con PMA por 45 minutos a 37 °C. Posteriormente y del mismo

modo que para el modelo murino, la marcación se realizó siguiendo los mismos pasos previamente mencionados. En todos los casos se tomó como aceptable el número de 50000 eventos. El diseño de las mezclas de anticuerpos se encuentra ejemplificado a continuación en la [Tabla 9](#):

Tabla 9. Diseño de mixes para FACS PBMCs (humanos).

	Mix 1	Mix 2	Mix 3
FL1 - FITC	ROS (DHR123)	HO-1 (Alexa Fluor 647)	CD4 (OKT4)
FL2 - PE	CD16 (3G8)	CD16 (3G8)	CD8 (SK1)
FL3 - PercP	CD120 (3G7A02)	CD120 (3G7A02)	CD120 (3G7A02)
APC	CD14 (63D3)	CD14 (63D3)	Tbet (4B10)

Anticuerpo (nº de clon)

Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados en base a la media para cada grupo con su correspondiente error estándar (SEM). El software utilizado para el análisis estadístico de los datos y la realización de las figuras fue el GraphPad Prism versión 8.06 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Los datos de correlación fueron analizados mediante el test de Pearson y su correspondiente coeficiente, en el caso de la comparación de medias o medianas fueron realizados los test de t de student o Mann-Whitney respectivamente. Para comparar los modelos de regresión lineal entre los grupos fue utilizado el test de Wald. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor p fue <0.05 siendo su representación estadística la siguiente: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 or **** p<0.0001.

Resultados

Objetivo 1. Poner a punto un modelo murino de Artritis Inducida por Colágeno (CIA) describiendo la respuesta inmune inflamatoria asociada.

A modo de abordar de forma local y sistémica, una enfermedad autoinmune de etiopatogenia compleja, nuestro primer objetivo se centró en la puesta a punto de un modelo murino de CIA. Desde el punto de vista clínico y en relación a los datos previamente mencionados; el modelo demostró tener un 68% de efectividad a la hora de desarrollar síntomas locales y obtener un score mayor a 1 en alguno de los miembros (*datos no mostrados*). Al momento de la segunda inyección (booster),

aproximadamente un 15% de los ratones debió ser sacrificado por presentar criterios de punto final, principalmente asociados a dificultad en la inyección subdérmica. Es importante también destacar, que dado la elevada severidad del modelo, un 8% de los ratones, para las condiciones de trabajo actuales, debieron ser sacrificados por presentar criterios de punto final. Dentro de los parámetros de punto final, los más frecuentes fueron: claros signos de dolor, pérdida de peso y ascenso ponderal mayor al 10% y pérdida de la cola posterior al sitio de inyección con lesión ulcerada sangrante.

Para la evaluación clínica de los principales signos de artritis, rubor y edema local, utilizamos en primera instancia fotos de referencia, para luego utilizar nuestras propias fotos de referencia como se observa en la Figura 8. Dentro de la evaluación clínica denotamos que sólo un 10% de los ratones tenían afección de los cuatro miembros, siendo principalmente el compromiso de pequeñas articulaciones especialmente las metacarpofalángicas y metatarsofalángicas, destacando que este 10% de los ratones desarrollaron artritis con un score promedio final ≥ 3 siendo la artritis clínicamente más severa. Para el 90% restante el score promedio final fue 2.4 siendo mayoritariamente a predominio de miembros inferiores (MI) y de carácter asimétrico. De forma cualitativa denotamos que la dificultad de los ratones en movilizarse fue proporcional al score clínico. Por lo previamente mencionado es que no contamos una tabla de referencia para los miembros superiores (MS), dado la ausencia de miembros afectados con un score de 3.

Es importante destacar que no denotamos signos clínicos de artritis en grandes ni medianas articulaciones, tales como la cintura escapular o la cintura pélvica. Además, no detectamos otros posibles síntomas asociados a una enfermedad sistémica como podrían ser lesiones, nódulos o afecciones diversas de la piel.

Score 0	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
				

Figura 8. Imágenes de referencia propias para la evaluación de signos clínicos de artritis posterior a la inmunización y booster con colágeno de tipo II de gallina: **Score 0 - normal; **Score 1** - leve rubor y edema de tobillo/muñeca definido, o rubor y edema limitado a dedos individuales, independiente del número de dedos; **Score 2** - Moderado rubor y edema de tobillo/muñeca; **Score 3** - Severo rubor y edema de la totalidad de la pata incluyendo los dedos; **Score 4** - Máxima inflamación del miembro que involucra múltiples articulaciones.**

Desde el punto de vista cinético, como era esperado, el promedio del aumento del diámetro de los MI, MS y de los cuatros miembros en relación al peso fue significativamente mayor en aquellos ratones inmunizados respecto a los controles (Figura 9 A-C). Del mismo modo, se observó un marcado aumento del score clínico posterior al booster, aumentando en líneas generales hasta el día 60 aproximadamente (Figura 9 D).

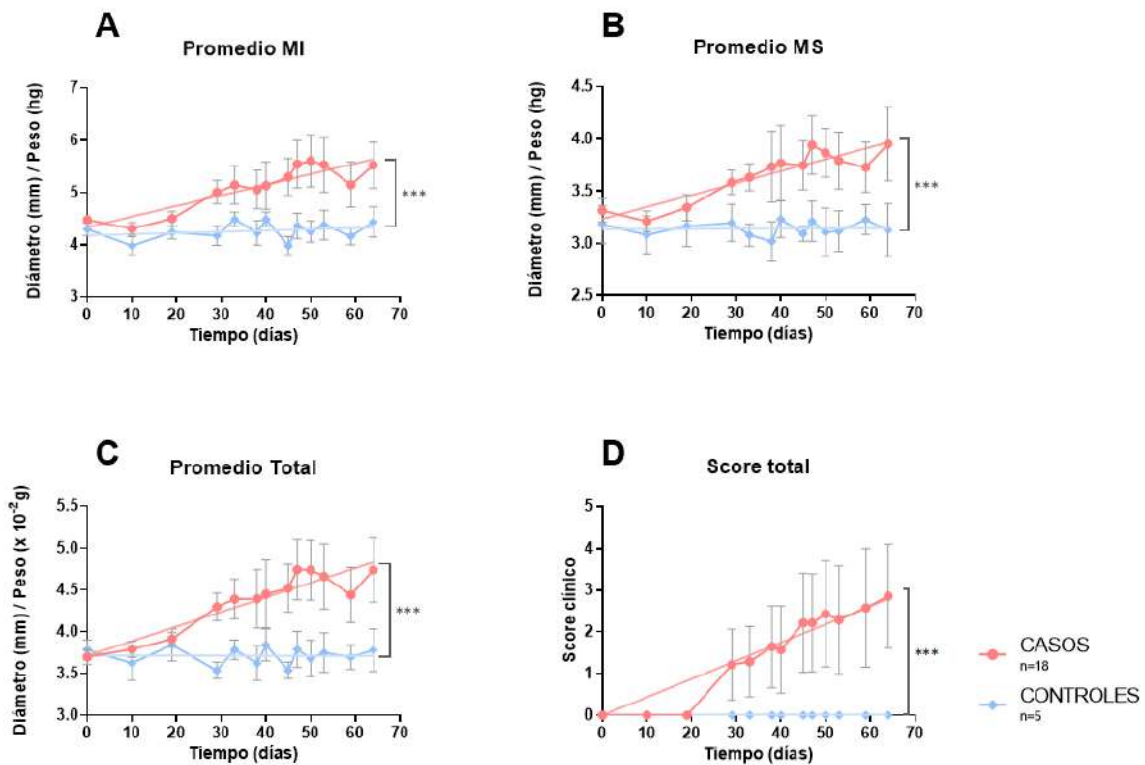


Figura 9. Evaluación clínica de artritis en el modelo murino inducido por colágeno.

Relación del diámetro promedio de los MI (A), MS (B) y todos los miembros (C) y el peso para cada animal en función del tiempo. D - Score clínico promedio de los cuatro miembros. En todos los casos el diámetro de los miembros fue normalizado al peso de cada animal. El día 0 corresponde a la inmunización inicial con colágeno, mientras que el día 21 al *booster*. Se muestra el promedio del grupo de **CASOS** respecto a **CONTROLES**. Para las cuatro gráficas se compararon las pendientes de las dos líneas de regresión mediante un test de interacción basado en un contraste de hipótesis asociado al test de Wald, ***p < 0.001.

Destacamos que en aquellos grupos de ratones cuyo score promedio fue menor de 2, la fase aguda de la artritis tuvo su pico máximo entre los días 40 y 50 posteriores a la primera inmunización. Respecto a la Figura 10, de no sacrificar a los ratones al día 70, esperaríamos una fase de meseta en los días subsiguientes como es descrito por diversos autores (108). Los resultados tabulados de la comparación de la media/mediana de las variables clínicas se encuentran en el Anexo 8.

Para el peso, en todas los grupos de ratones inyectados, la media fue estadísticamente mayor en el grupo de los controles respecto a los casos, lo cual está claramente asociado a la severidad del modelo (*datos no mostrados*).

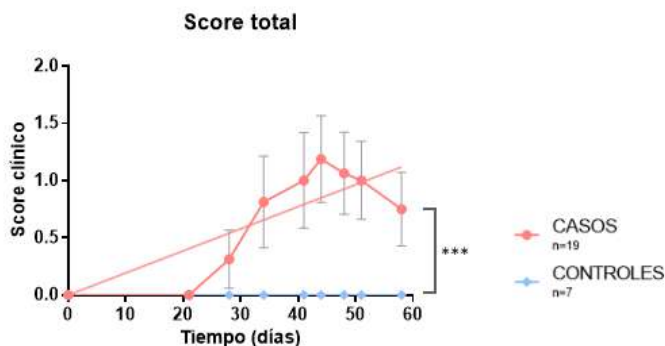


Figura 10. Evaluación clínica de artritis comparando **CASOS** respecto a **CONTROLES**. Se denota un claro cambio del signo de la pendiente posterior al ápex del día 42. Se compararon las pendientes de las dos líneas de regresión mediante test de interacción basado en contraste de hipótesis, *** $p < 0.001$.

Para analizar la relación entre el score clínico murino con los scores clínicos de actividad para AR (Figura 11), como el DAS28 , graficamos la correlación entre el score total al día final en función del promedio total de los 4 miembros ajustado al día final (Figura 11A). Esto nos permitió validar clínicamente un parámetro subjetivo, como el score, con uno más objetivo, como es el diámetro de los miembros inflamados, denotando una clara correlación positiva ($R = 0.728$). Del mismo modo y con una clara comparación con el DAS28, dentro de la validación paraclínica, el score total al día final mostró una correlación positiva ($R = 0.783$) con un parámetro humoral inflamatorio e inespecífico como lo es la PCR en plasma (Figura 11B). Destacamos que en la Figura 11B fueron incluidos aquellos ratones inmunizados que no desarrollaron clínicamente artritis los cuales, como era esperado presentaron valores de PCR en plasma (mg/dL) menores.

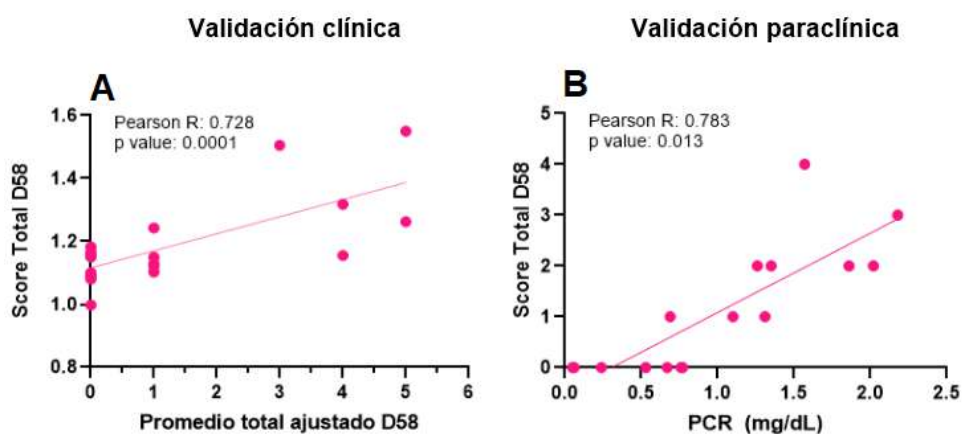


Figura 11. Validación clínica y paraclínica del modelo murino de CIA en comparación con el score de actividad para Artritis Reumatoide DAS28. Correlación entre el score total al día final (D58) y el promedio total ajustado al día final (A) o la Proteína C Reactiva en plasma (B) de ratones inmunizados. Correlación de Pearson.

Al tratarse de un modelo de inmunización cuya patogenia radica en la formación de anticuerpos contra el colágeno de tipo II de gallina, realizamos la titulación de anticuerpos en plasma (Figura 12) a modo de evaluar la inmunidad adaptativa humoral y su fenotipo. Esperablemente, aquellos ratones no inmunizados no desarrollaron anticuerpos con especificidad por el colágeno tipo II de gallina (Figura 12A). A grandes rasgos, denotamos un claro cambio de clase de isotipo hacia IgG, probablemente asociado al *booster* así como al uso de adyuvantes que prolongan la presentación antigénica y respuesta inflamatoria local (Adyuvante de Freund completo). Como sugerido por el protocolo de CIA de la empresa Chondrex, dado la relevancia biológica para el modelo, realizamos la determinación de Unidades Internacionales de anticuerpos anti colágeno de tipo II de gallina en base al STD comercial (Figura 12B).

En adición a lo previamente mencionado, encontramos una correlación positiva entre el título de anticuerpos totales (Figura 13A) y de anticuerpos IgG2a (Figura 13B) en plasma de los ratones inmunizados con el score total de actividad, determinando que a mayor título de anticuerpos, mayor es la severidad de la artritis evaluada por sus signos clínicos. Sin embargo, no encontramos una correlación positiva estadísticamente significativa entre el promedio de los MS, promedio de los MI, o Promedio Total con los títulos de anticuerpos, si bien la pendiente de correlación fue positiva (*datos no mostrados*).

Evaluación de respuesta humoral

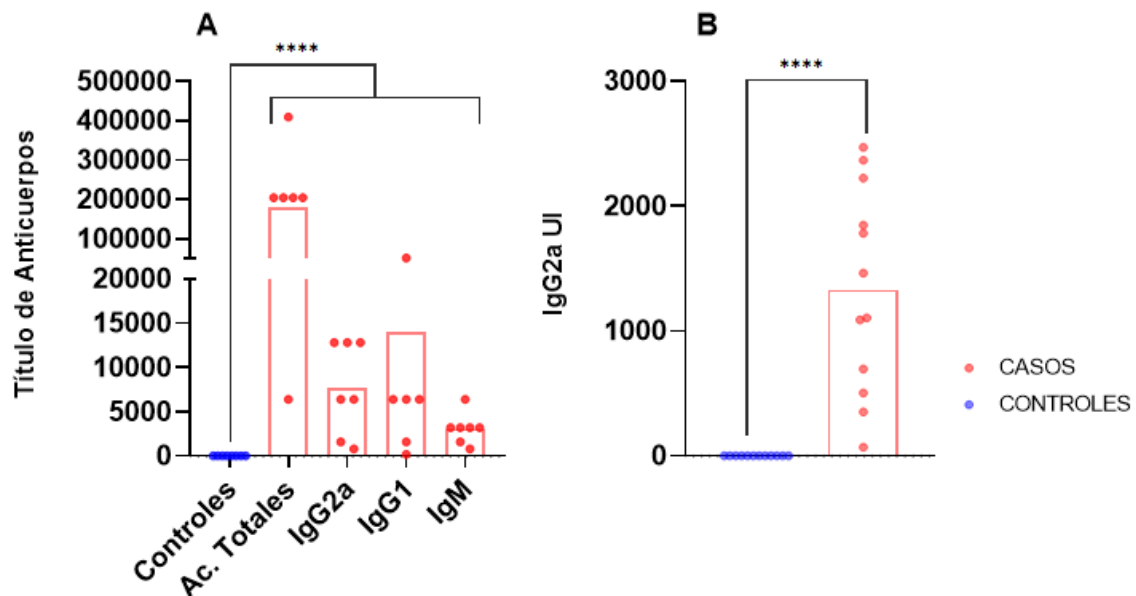


Figura 12. Evaluación de la respuesta humoral a la inmunización con colágeno tipo II de gallina en ratones C57BL/6. **A** - Titulación de anticuerpos IgG2a, IgG1 e IgM en plasma de ratones inmunizados (**CASOS**) en comparación con los ratones no inmunizados (**CONTROLES**) determinada por ELISA indirecto. **B** - Determinación de las Unidades Internacionales (UI) de anticuerpos anti-colágeno tipo II de gallina del isotipo IgG2a. Mann-Whitney test **** $p < 0.0001$.

Correlación Anticuerpos y Score Total

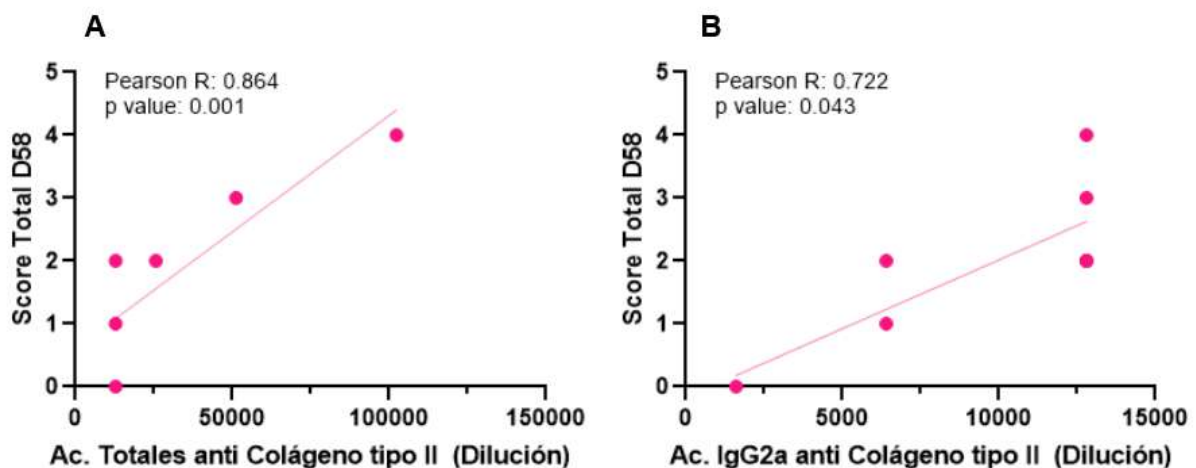


Figura 13. Correlación entre títulos de anticuerpos contra colágeno tipo II de gallina y score clínico al D58 (sacrificio). **A** - Correlación positiva entre el score total al día final (D58) y el título de anticuerpos totales contra colágeno tipo II de gallina determinados en plasma ($R = 0.864$) **B** - Correlación positiva entre el Score total al día

final (D58) y el título de anticuerpos de isotipo IgG2a contra colágeno tipo II de gallina determinados en plasma ($R = 0.722$). Correlación de Pearson.

Para confirmar si efectivamente la respuesta inmune humoral adaptativa, es decir, los anticuerpos específicos para el colágeno, tienen un posible rol en la patogenia de la enfermedad, determinamos la presencia de anticuerpos anti-colágeno en líquido proveniente del procesamiento de las muestras articulares de los **CASOS**, siendo hallados valores positivos para todos los isotipos evaluados (*datos no mostrados*).

Para completar la evaluación de la respuesta inmune adaptativa, analizamos la respuesta celular T. En primera instancia determinamos el tamaño de los ganglios linfáticos inguinales drenantes, siendo este el primer repel anatómico de la cadena ganglionar observable a simple vista durante la disección. La comparación macroscópica posterior a la remoción de los mismos puede verse en la Figura 14 y la determinación estadística de la diferencia a través del análisis con ImageJ® puede observarse en la Figura 15A.

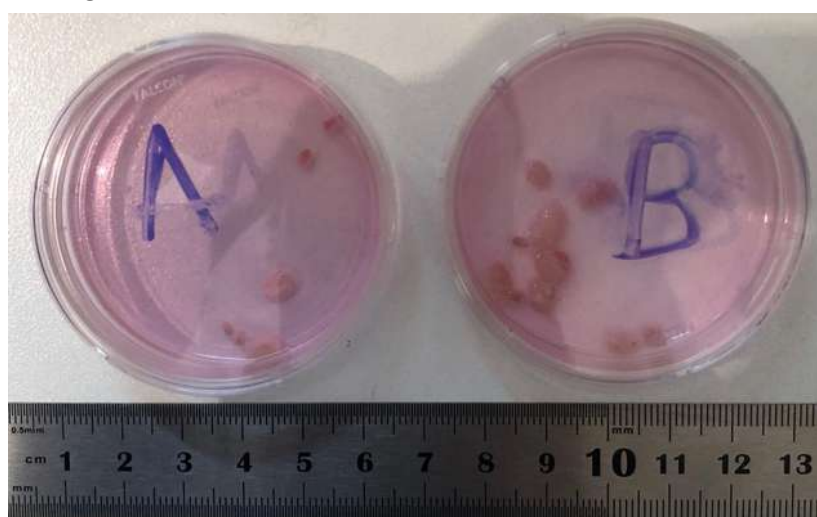


Figura 14. Comparación de ganglios linfáticos inguinales posterior a su remoción, siendo A el grupo de **CONTROLES** y el rótulo B correspondiente a los **CASOS**.

Dentro de la evaluación del modelo, posterior a la determinación del fenotipo de la inmunidad adaptativa humoral, realizamos una aproximación al estudio de la inmunidad adaptativa celular, a través del un ensayo de activación y proliferación de células derivadas de los ganglios inguinales de los ratones en presencia de un estímulo policlonal (anti-CD3/CD28) y posterior producción de IFN γ determinada por ELISA sándwich en el sobrenadante de cultivo (Figura 15B). Denotamos niveles elevados de IFN γ en los medios de cultivo de células ganglionares de ratones inmunizados (**CASOS**) en comparación con los **CONTROLES** tanto en condiciones basales, como frente a estímulos con anti-CD3/CD28. Destacamos que no detectamos cambios significativos en los niveles de IFN γ frente a la estimulación de

células derivadas de los ganglios linfáticos con colágeno tipo II de gallina tanto entre los grupos como comparando intragrupo con la condición de medio respectiva (*datos no mostrados*).

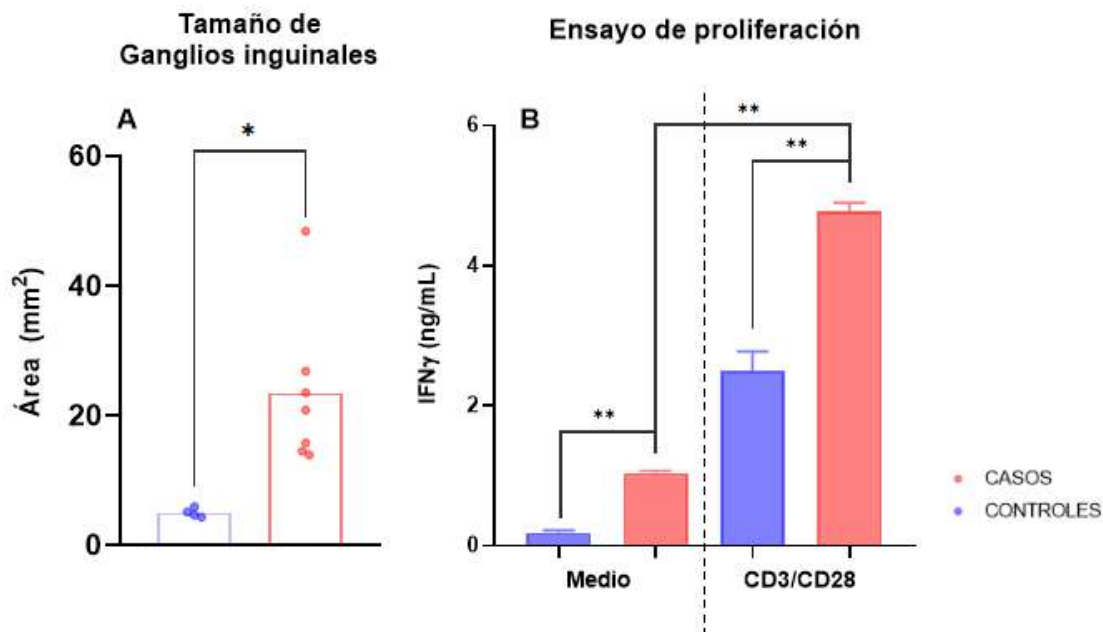


Figura 15. Evaluación de la respuesta celular adaptativa. **A** - Comparación del tamaño de los ganglios por la determinación del área en mm² a través del programa ImageJ®. **B** - Determinación de IFN γ por ELISA sándwich en condiciones basales o frente al estímulo policlonal usando anticuerpos específicos de CD3 y CD28. Mann Whitney test: * p < 0.05, ** p < 0.01.

Por último, para seguir profundizando en la caracterización inmunológica de nuestro modelo murino de artritis, cuantificamos una serie de citoquinas en plasma por ELISA sándwich (Figura 16).

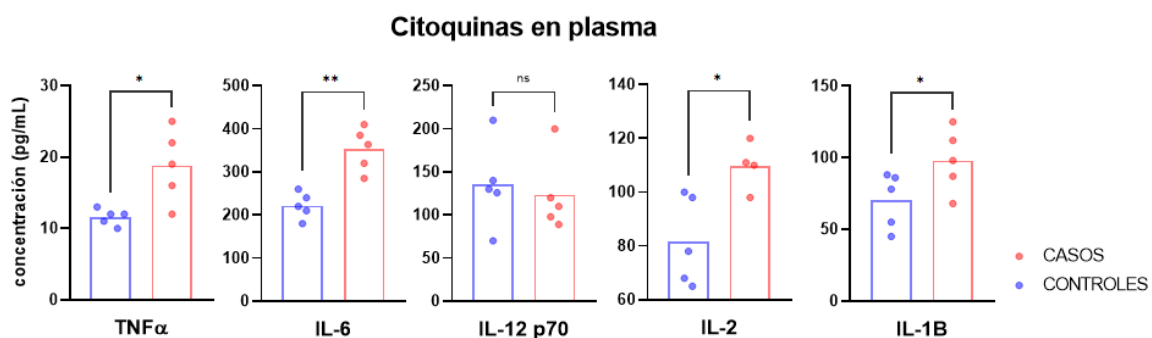


Figura 16. Determinación de concentración de citoquinas inflamatorias en plasma de ratones artríticos. Se determinaron los niveles de TNF α , IL-6, IL-12p70, IL-2, IL-1 β por ELISA sándwich utilizando anticuerpos específicos en ratones con artritis (**CASOS**)

en comparación con los ratones no inmunizados (**CONTROLES**). Mann Whitney test: ns - no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Podemos observar un claro predominio de mayores concentraciones en plasma de todas las citoquinas pro-inflamatorias evaluadas a excepción de la IL-12p70. Como era esperable, para nuestras condiciones de trabajo, la citoquina cuya concentración alcanzó mayores valores fue la IL-6 con un franco aumento en los ratones artríticos. Sin embargo, inesperadamente, se detectaron menores niveles de TNF α en comparación con las otras citoquinas estudiadas tanto para los **CASOS** como para los **CONTROLES**.

Objetivo 2. Caracterizar las poblaciones monocíticas circulantes y macrofágicas sinoviales en el modelo de CIA.

El abordaje celular inicial de la respuesta inmunológica se realizó a través de un hemograma determinado por tamaño/volumen en un equipo automatizado. En la Figura 17A se observa el primer abordaje de las tres series, eritroide, leucocitaria y plaquetaria. Se observó una disminución significativa de los glóbulos blancos y las plaquetas en los casos con respecto a los controles. Cabe destacar que el número de las plaquetas determinado no corresponde a una plaquetopenia ni a valores fuera del rango de seguridad.

Hemograma

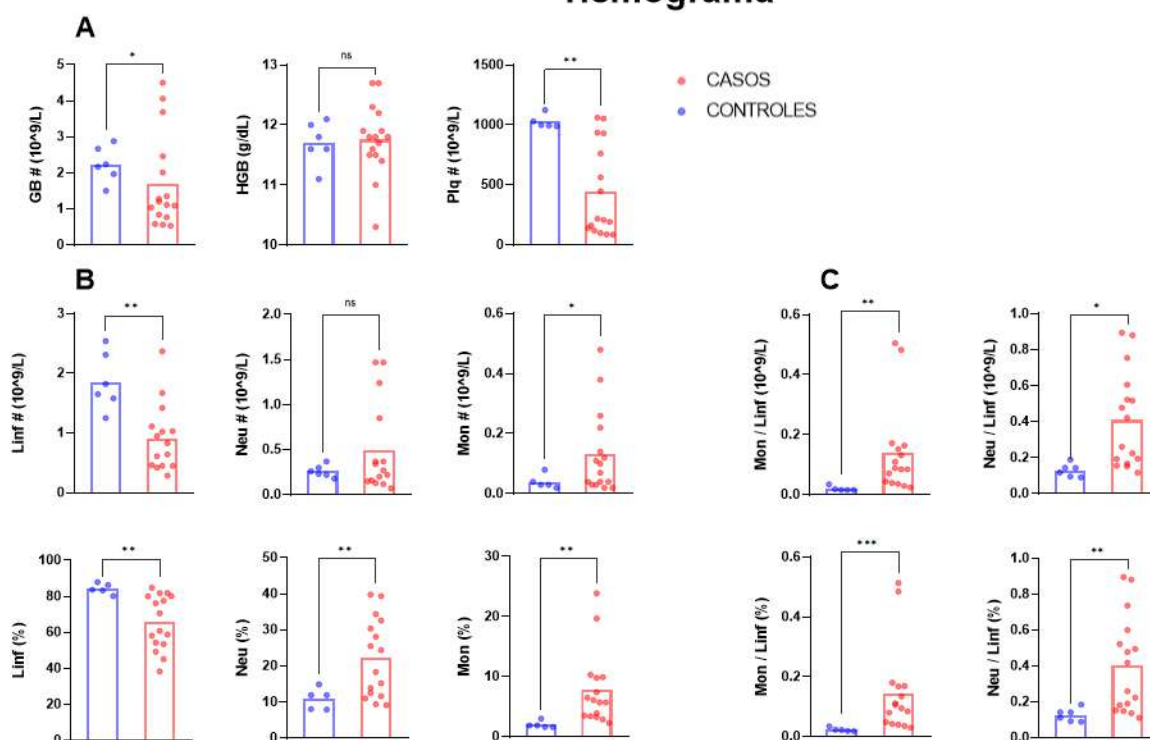


Figura 17. Resultados del hemograma básico realizado en equipo automático por tamaño, comparación **CONTROLES** y **CASOS** . **A** - Abordaje primario de las tres series principales. **B** - Número y porcentaje de las principales series leucocitarias. **C** - Coeficientes de monocitos y neutrófilos en función de linfocitos. GB (glóbulos blancos), HGB (hemoglobina), Plq (plaquetas), Linf (linfocitos), Neu (neutrófilos), Mon (monocitos), Mon / Linf (Ratio Monocito-Linfocito MLR), Neu / LINF (Relación Neutrófilo-Linfocito NLR). Si la distribución fue normal, se realizó t de student, si la distribución no fue normal se realizó Mann Whitney test: ns - no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Dado este hallazgo no esperable desde el punto de vista patogénico, exploramos una posible correlación entre el número de plaquetas respecto al score de actividad en los ratones artríticos, encontrando una correlación negativa que sugiere que a mayor score de actividad, menor es el conteo plaquetario (Figura 18). No encontramos diferencias en la concentración de hemoglobina ni una tendencia a la disminución en los **CASOS** con respecto a los **CONTROLES** (Figura 17A). La dispersión de los valores de hemoglobina para los **CASOS** fue considerablemente mayor que para los **CONTROLES**, aunque no denotamos una clara correlación con la actividad de la enfermedad (*datos no mostrados*).

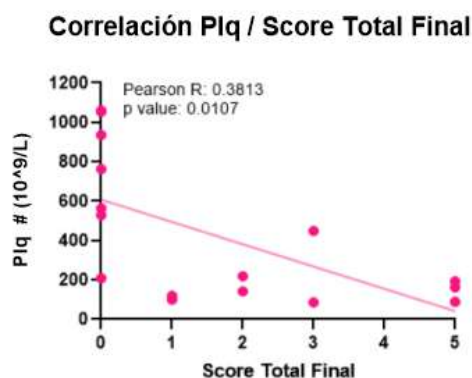


Figura 18. Correlación entre el conteo plaquetario y el Score clínico al D58 (R=0.3813) de los **CASOS**. Correlación de Pearson. Plq (plaquetas).

Posteriormente, evaluamos las diferentes series leucocitarias (Figura 17B y Figura 19). Observamos un cambio en los porcentajes en estas poblaciones en los ratones artríticos (**CASOS**) con respecto a los **CONTROLES**, conduciendo a un aumento de la serie monocítica y neutrofílica a expensas de la serie linfocitaria (Figura 19).

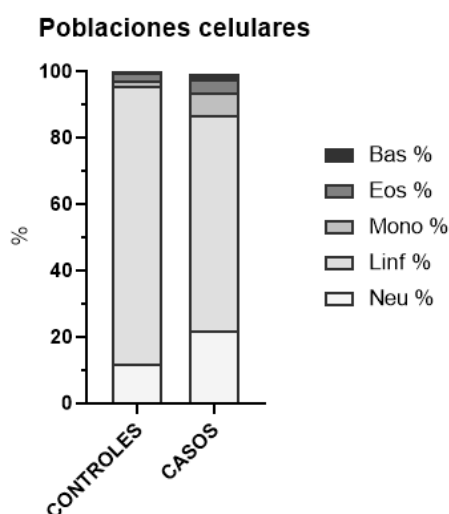


Figura 19. Porcentaje de poblaciones celulares de glóbulos blancos, representadas sobre un total de 100% para **CONTROLES** y **CASOS**. Bas (basófilos), Eos (eosinófilos), Mono (monocitos), Linf (linfocitos), Neu (neutrófilos).

Observamos un aumento en el número y porcentaje de neutrófilos y monocitos en los **CASOS** con respecto a los **CONTROLES** (Figura 17B). Sin embargo, evidenciamos una disminución del número y porcentaje de la serie linfocitaria (Figura 17B). Para profundizar en este resultado, según la evidencia previamente citada, determinamos el índice monocito/linfocito y neutrófilo/linfocito tanto para el conteo como para su valor porcentual, denotando un marcado aumento del índice en los casos (Figura 17C). Este parámetro nos permite comparar dos poblaciones leucocitarias de rápido

desarrollo frente a factores inflamatorios en referencia a la población cuyo crecimiento basal es menor.

Detallando los datos sobre el MLR el grupo **CASOS** presenta una mediana de 0.087, una media de 0.14 y un SD de 0.15. La diferencia entre la mediana y la media sugiere una distribución asimétrica con valores elevados que pueden estar sesgando el promedio hacia arriba. En contraste, en el grupo **CONTROLES**, la mediana es de 0.018, la media de 0.024 y el SD de 0.011, indicando que los valores están más concentrados alrededor del promedio y con menor dispersión.

En la relación al NLR, el grupo **CASOS** muestra una mediana de 0.34, una media de 0.41 y un SD de 0.27, lo que sugiere una alta variabilidad y posibles valores extremos que elevan la media. En cambio, el grupo **CONTROLES** tiene una mediana de 0.13, con una media idéntica de 0.13 y un SD de 0.037, lo que refleja una distribución más homogénea y estable.

En general, los **CASOS** con AR presentan valores más elevados y una mayor variabilidad en las proporciones de monocitos y neutrófilos en relación con los linfocitos, mientras que en los **CONTROLES** los valores son más bajos y homogéneos. Esto sugiere un desbalance inmunológico característico de la enfermedad, con una mayor presencia relativa de monocitos y neutrófilos.

A modo de profundizar en la inmunidad celular asociada a la patogenia inflamatoria de los ratones artríticos, evaluamos a partir de sangre total por citometría de flujo, el número y fenotipo de poblaciones celulares seleccionadas.

Utilizando como marcador de células mieloides a CD11b, determinamos que en sangre periférica, en concordancia con lo evaluado de forma rudimentaria en el hemograma, existe un mayor número y porcentaje de células CD11b⁺ en los **CASOS** (Figura 14). Asimismo, detectamos un aumento en las células CD11b⁺ y Ly6C⁺ en los **CASOS** con respecto a los **CONTROLES**, lo que sugiere un aumento de monocitos en circulación de estos animales (Figura 20A). Posteriormente, determinamos la presencia ROS en las células CD11b⁺ Ly6C⁺ (Figura 20B), encontrando mayores niveles de ROS en las células derivadas de ratones artríticos (**CASOS**). Estas células, además, presentaron una menor expresión de HO-1 en los **CASOS** (Figura 18B).

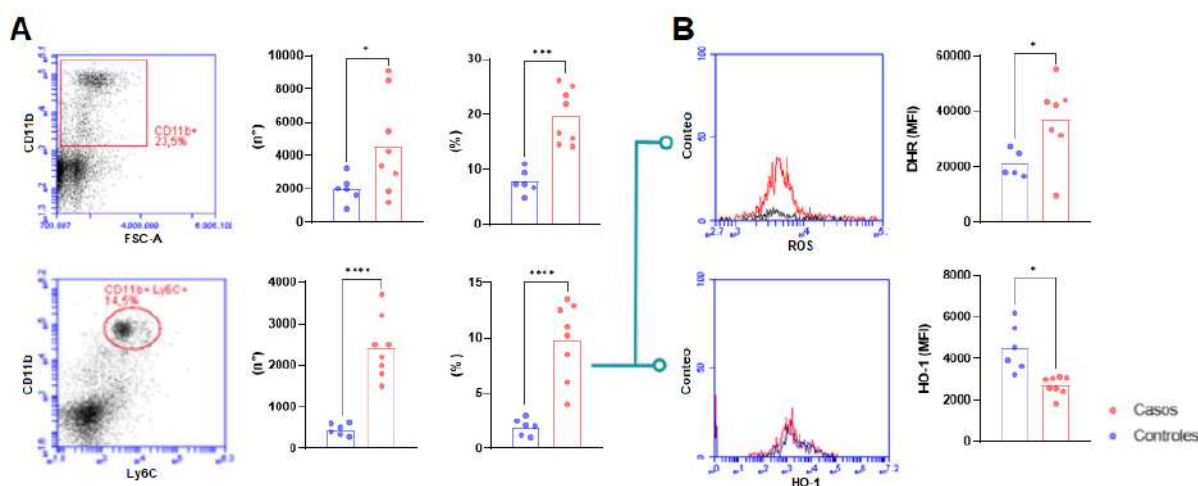


Figura 20. Identificación de células mieloides en sangre periférica. A - Población mieloide CD11b⁺ (arriba) y de monocitos típicos CD11b⁺ Ly6C⁺ (abajo) detectada por citometría de flujo en sangre previamente lisada de ratones. **B** - Expresión de HO-1 y detección de ROS (utilizando la sonda DHR123) en células CD11b⁺ Ly6C⁺. En todos los casos se comparan **CASOS** y **CONTROLES**. Mann Whitney test: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Posterior al abordaje sistémico y periférico, decidimos analizar las células del tejido articular, a modo de evaluar el número, porcentaje y fenotipo de las poblaciones celulares de interés (Figura 21A). En concordancia con los resultados evaluados en sangre periférica, el número y porcentaje de las células de origen mieloide (CD11b⁺) fueron mayores a nivel local en los **CASOS** que en los **CONTROLES**. Utilizando nuevamente la sonda DHR123 para la determinación de ROS, denotamos un aumento, tanto en número como en porcentaje, de una subpoblación productora de altos niveles de ROS (CD11b⁺ ROS^{hi}) en los **CASOS** en relación a los **CONTROLES**. Como no esperamos encontrar una población monocítica activa en articulación, seleccionamos un marcador de diferenciación asociado a un fenotipo macrófagico, como lo es F4/80, encontrando un menor número y porcentaje de células F4/80⁺ en el tejido articular de los **CASOS** (Figura 21A). La expresión de MHC II en estas células fue similar entre **CASOS** y **CONTROLES** (Figura 21B). En concordancia con los resultados previamente enunciados y remarcando la tendencia de este análisis, la expresión de CD68 fue mayor en los **CONTROLES**. Por otro lado, no encontramos diferencia significativa en la producción de ROS.

Por último y según nuestros resultados previos, decidimos evaluar la expresión del factor de transcripción IRF5 asociado con la regulación de la respuesta inmune innata y la inflamación. Una alta expresión de IRF5 caracteriza a los macrófagos inflamatorios de tipo M1 (Figura 7). A nivel tisular, determinamos un mayor número y porcentaje de células F4/80⁺ IRF5⁺ en los casos con respecto a los controles (Figura 21). Además, evaluamos la expresión intracelular de la HO-1 en esta población,

encontrando, de forma atípica una sobreexpresión de esta enzima inmunoreguladora en los casos en relación a los controles (Figura 21).

De forma complementaria, no observamos una diferencia entre la población F4/80⁺ e IRF4⁺ ni en la expresión de este factor de transcripción en los casos (*datos no mostrados*).

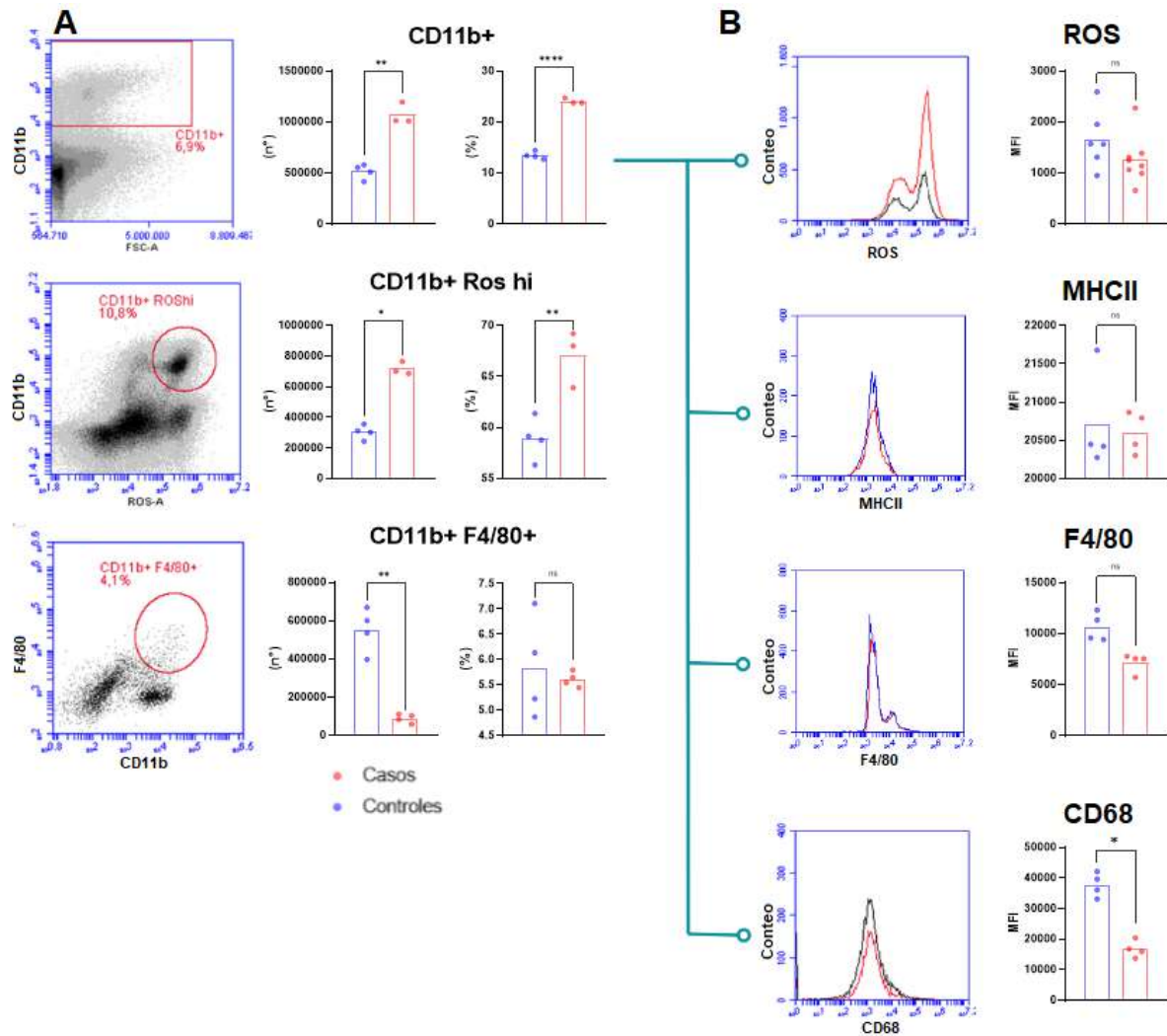


Figura 21. Identificación de células CD11b⁺ en células articulares. **A** - Número y porcentaje de células CD11b⁺, CD11b⁺ ROS^{hi} y en casos y controles por citometría de flujo. **B** - Expresión de ROS, MHC II, F4/80 y CD68 en la población celular CD11b⁺, siendo la expresión de MHC II, F4/80 y CD68 determinada utilizando anticuerpos específicos, mientras que la presencia de ROS utilizando la sonda DHR 123 por citometría de flujo. De forma complementaria, vemos la evaluación fenotípica de las células CD11b⁺ para la producción de ROS, su perfil macrofágico según F4/80 y CD68. Mann Whitney test: ns - no significativo, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.0001.

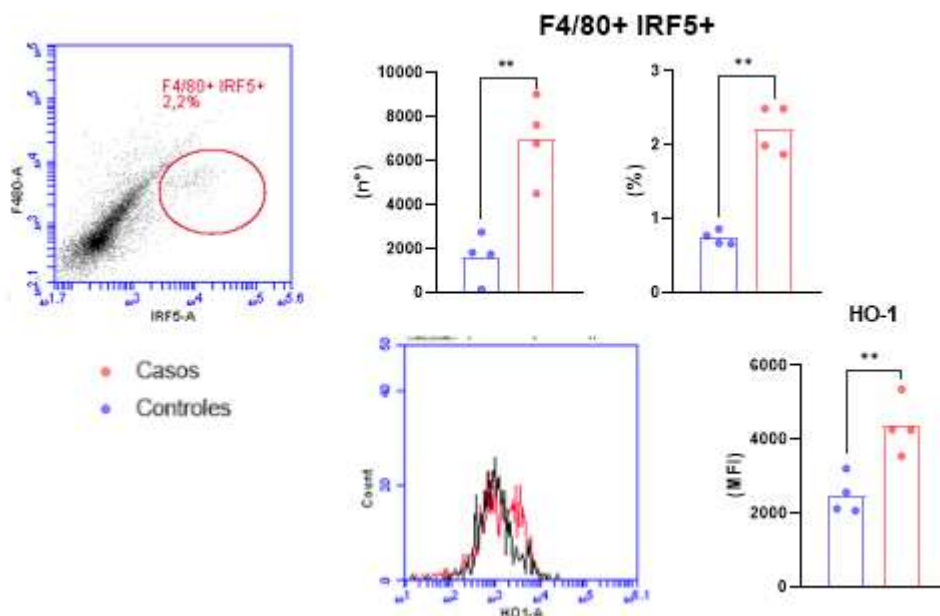


Figura 22. Identificación de células F4/80⁺ IRF5⁺ en articulación. A partir de una suspensión celular de articulación proveniente de ratones artríticos (**CASOS**) o **CONTROLES** se realizó una marcación con anticuerpos específicos de F4/80, IRF5 y HO-1. **A** - Dot plot indicando la gate F4/80⁺ IRF5⁺. **B** - Número y frecuencia de células F4/80⁺ IRF5⁺ en casos y controles. **C** - Expresión de HO-1 en células F4/80⁺ IRF5⁺. Mann Whitney test: ns - no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Para complementar estos análisis buscamos evaluar la expresión génica de diversas enzimas relacionadas con la producción de ROS, como la SOD1, SOD2 y PRDX1 en células provenientes de las articulaciones tanto de casos como de los controles, así como del factor de transcripción Nrf2 de respuesta anti-oxidante (Figura 23). No detectamos evidencias de diferencias significativas entre **CASOS** y **CONTROLES** en ninguna de estas moléculas (Figura 23). Tampoco se evidenció una clara relación entre los valores obtenidos y la actividad de la artritis para los **CASOS** (*datos no mostrados*). Como parámetro antiinflamatorio central en nuestra investigación, se denotó una tendencia en la disminución de niveles de la expresión de HO-1 en los casos. Dado el escaso contenido de ARN extraído y la baja calidad del cDNA se decidió *poolear* grupos de ratones y realizar réplicas metodológicas, lo cual se correlaciona con el escaso número de células detectado por citometría de flujo.

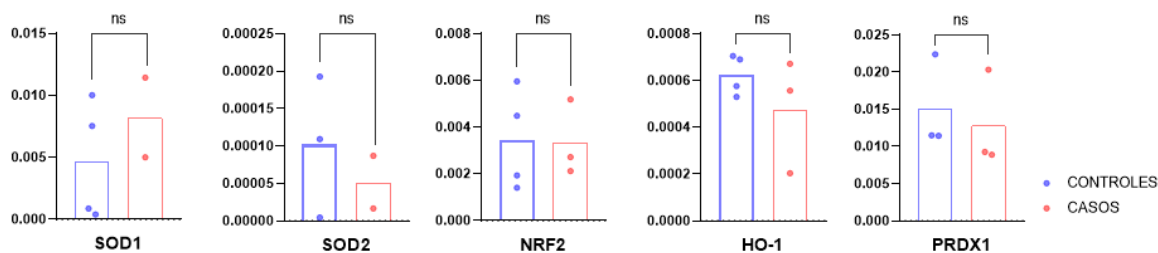


Figura 23. Evaluación por qRT-PCR de enzimas claves en el ambiente inflamatorio/anti inflamatorio vinculadas a la producción de ROS y el ambiente anti-inflamatorio mediante qRT-PCR con primers específicos para la superóxido dismutasas (SOD) 1 y 2, peroxirredoxina (PRDX) 1, el factor de transcripción NRF2 y como parámetro anti-inflamatorio la HO-1 . Mann Whitney test: ns - no significativo

Objetivo 3. Esclarecer el rol de las ROS en el desarrollo del modelo murino de CIA utilizando la cepa GP91^{phox} K.O (B6.129S-Cybbtm1Din/J) caracterizando sus aspectos proinflamatorios clínicos y humorales.

A modo de profundizar en la producción de ROS y su rol controversial descrito para la AR, reproducimos el mismo modelo CIA en una cepa deficiente en la subunidad de la NAD(P)H Oxidasa, gp91phox.

La subunidad gp91phox es uno de los principales componentes catalíticos del complejo enzimático NOX2. Este complejo es esencial en la producción de ROS mediante la transferencia de electrones desde NADPH al oxígeno molecular. En el contexto de la inflamación crónica, como ocurre en la artritis reumatoide, la generación de ROS por parte de NOX2 ha sido vinculada tanto a mecanismos protectores como a procesos de daño tisular. Su función dual, dependiendo del entorno redox y del balance entre los sistemas antioxidantes y prooxidantes, subraya su papel controversial en la modulación del proceso inflamatorio.

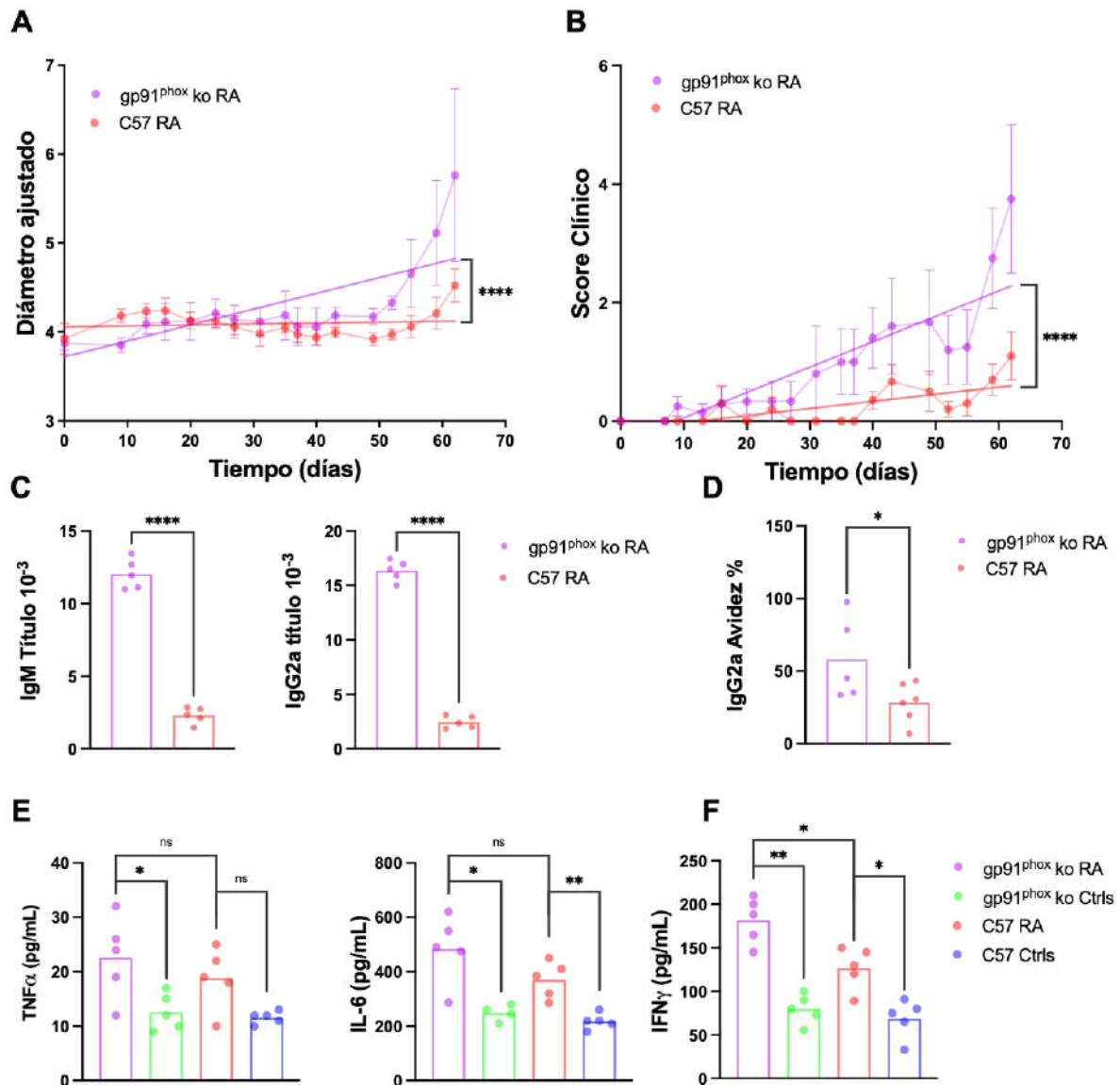


Figura 24. Evaluación del perfil clínico e inmunológico en el modelo de AR deficientes de ROS comparando CASOS para la cepa GP91phox K.O respecto a sus **CONTROLES para la cepa GP91phox K.O** y su comparación con el modelo inicial en la cepa **C57BL/6** tanto para los **CASOS littermates RA** como para sus **CONTROLES littermates Ctrls**. **A** - Relación de aumento del diámetro promedio total ajustado por peso para la cepa **GP91phox K.O** en función de los días posteriores a la inmunización (día 0) y al booster (día 21). **B** - Relación de aumento del score clínico promedio para los **CASOS** con fondo genético de la cepa **GP91phox K.O** en comparación de aumento del diámetro promedio total para los **CASOS** de la cepa **C57BL/6** en función de los días posteriores a la inmunización (día 0) y al booster (día 21). Para **A** y **B** se compararon las pendientes de las dos líneas de regresión mediante un test de interacción basado en un contraste de hipótesis. **C** - Comparación del título para Ac. IgM e IgG2a mediante un ELISA indirecto. Los títulos fueron determinados en base al punto de corte con el suero de ratones no inmunizados, estableciendo la relación con la absorbancia del título mayor con el valor de absorbancia del control negativo,

comparación entre ratones artríticos de ambas cepas. **D** - Determinación de la avidéz para los isotipo IgG2a para ambas cepas de ratones. Se realizó un ELISA indirecto realizando un paso de incubación con urea luego de la incubación de los anticuerpos para eliminar los anticuerpos de baja avidéz. Siendo el porcentaje determinado en relación al 100% considerando la condición con PBS y la comparación con la condición de urea. **E** - Determinación de niveles de citoquinas inflamatorias en plasma. Se realizó un ELISA de tipo sándwich utilizando anticuerpos específicos. **F** - Determinación de IFN γ por ELISA sándwich frente al estímulo policlonal usando anticuerpos específicos de CD3 y CD28 de células provenientes de ganglios inguinales. Para **C**, **D**, **E** y **F** Mann Whitney test. ns - no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0001$.

Como se observa en la Figura 24A, el diámetro promedio de los cuatros miembros fue marcadamente mayor en los ratones artríticos de la cepa **GP91phox K.O** en comparación a la **C57BL/6**. Respecto al momento del desarrollo de artritis, no denotamos un inicio precoz para ninguno de los dos grupos, ya que se detectaron los signos clínicos a partir del día 50, como vimos para los grupos previos de ratones. Este primer resultado clínico se traduce y correlaciona en la diferencia del Score Total, siendo significativamente superior en la cepa **GP91phox K.O** (Figura 24B). Desde el punto de vista cualitativo, las características del modelo resultaron similares para ambas cepas, sin haber cambios en el desarrollo de artritis, que rondó en un 72% para la cepa GP91phox K.O y un mismo porcentaje de ratones sacrificados por tener criterios de punto final al momento del *booster* y en la evolución posterior. Tampoco hubo diferencias en los parámetros de punto final utilizados para el sacrificio de los ratones con índices de severidad. El porcentaje de los ratones con los cuatros miembros afectados fue el mismo para ambas cepas (10%) e igual al previamente descrito en nuestro modelo inicial. La afección fue predominantemente en miembros inferiores. No se detectaron signos clínicos de artritis en grandes ni medianas articulaciones ni otros síntomas de enfermedad sistémica en ninguna de las cepas analizadas.

A modo de evaluar la respuesta inmune humoral adaptativa, en el mismo contexto que para el modelo inicial, realizamos la titulación de anticuerpos contra colágeno de tipo II de gallina en el plasma de los ratones inmunizados (Figura 24C). Los animales artríticos deficientes en **GP91phox** presentaron mayores títulos de anticuerpos específicos de colágeno en relación a los expresados por la cepa **C57BL/6**. Este resultado se evidenció para todos los isotipos analizados (Figura 24C).

Para profundizar y comparar la respuesta humoral de ambas cepas, en búsqueda de un posible vínculo entre la inmunidad innata y adaptativa, decidimos determinar mediante un ELISA Indirecto con urea la avidéz del isotipo IgG2a el más vinculado al modelo (Figura 24D). De forma relevante, determinamos que la avidéz de los

anticuerpos de isotipo IgG2a fue significativamente mayor en la cepa **GP91phox K.O**. Estos resultados reafirman y complementan los datos obtenidos en la titulación y potencialmente vinculan desde el punto de vista biológico con la patogenia de la artritis y la función efectora de los diferentes isotipos de anticuerpos.

De forma similar a lo descrito previamente, llevamos a cabo la medición por ELISA indirecto de citoquinas plasmáticas proinflamatorias características del perfil Th1 como lo son TNF α , IL-6 (Figura 24E). Si bien evidenciamos una clara tendencia a obtener concentraciones mayores de las dos citoquinas en plasma para la cepa **GP91phox K.O**, estas no fueron estadísticamente significativas.

Para evaluar el tenor de la respuesta inmune adaptativa celular y su fenotipo Th1 se realizó del mismo modo un ensayo de proliferación de LT estimulados con anti-CD3/CD28 por 72 horas a 37° C, detectándose una mayor nivel de IFN γ para la cepa **GP91phox K.O**.

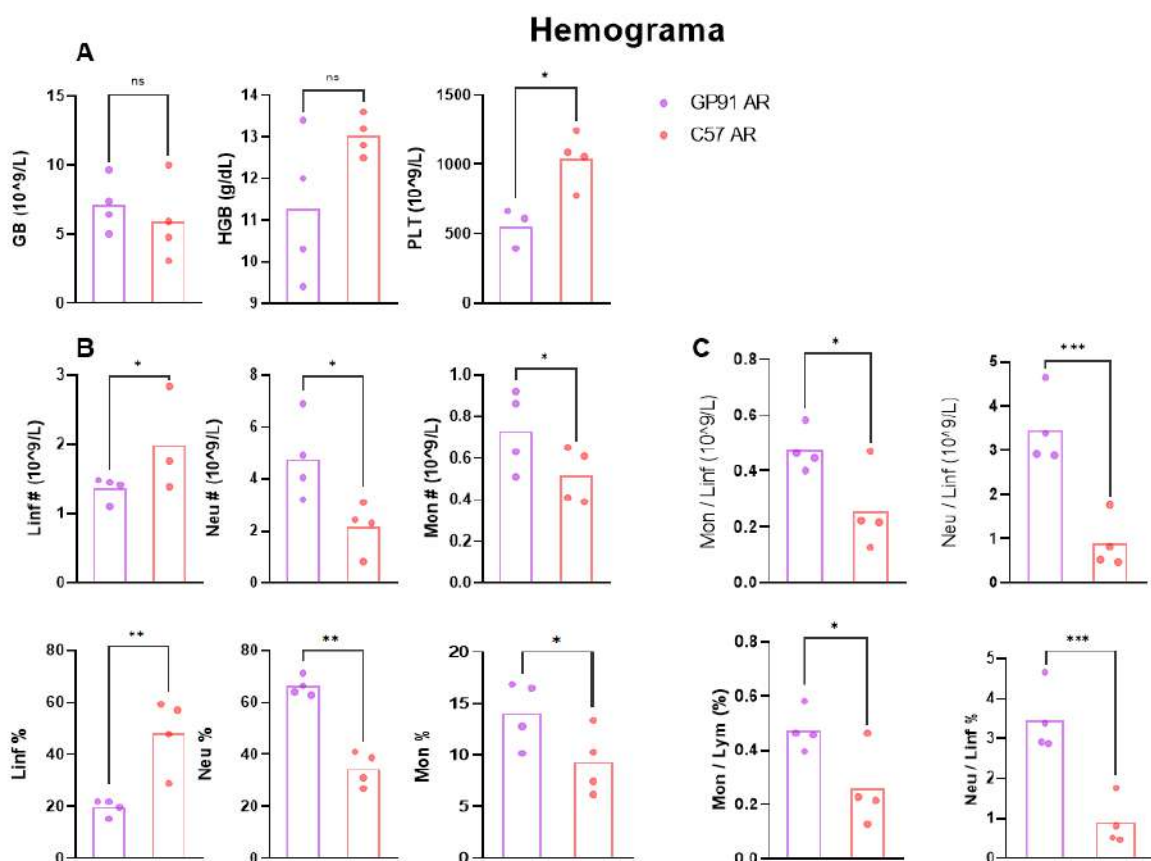


Figura 25. Resultados del hemograma básico de muestras de sangre periférica de ratones realizado en equipo automático por tamaño, comparación **CASOS GP91phox**

K.O y **CASOS C57** . **A** - Abordaje primario de las tres series principales. **B** - Número y porcentaje de las principales series leucocitarias. **C** - Coeficientes de monocitos y neutrófilos en función de linfocitos. GB (glóbulos blancos), HGB (hemoglobina), Plq (plaquetas), Linf (linfocitos), Neu (neutrófilos), Mon (monocitos), Mon/Linf (Ratio Monocito-Linfocito MLR), Neu/LINF (Relación Neutrófilo-Linfocito NLR). Si la distribución fue normal, se realizó test t de student, si la distribución no fue normal se realizó Mann Whitney test: ns - no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Nuevamente el abordaje celular inicial de la respuesta inmunológica se realizó a través de un hemograma determinado por tamaño/volumen en un equipo automatizado. En el primer abordaje de las tres series, no denotamos diferencia en el conteo total de glóbulos blancos, ni en los valores de hemoglobina, aunque sí se evidenció una cierta tendencia a tener concentraciones menores en los ratones provenientes de la cepa deficiente en **GP91phox**, lo cual podría estar asociado a la respuesta inflamatoria sistémica más severa (Figura 25A). Del mismo modo que para el modelo inicial, se determinó un menor conteo plaquetario estadísticamente significativo para los ratones **GP91phox K.O** respecto a los salvajes **C57BL/6**, lo cual también podría estar *-de forma atípica-* relacionado con la respuesta inflamatoria sistémica crónica.

Evaluando específicamente la serie blanca o leucocítica, sorpresivamente evidenciamos una disminución tanto en número y porcentaje de la serie linfocitaria en los ratones **GP91phox K.O** (Figura 25B), lo cual también nos podría dar un indicio de su asociación con la respuesta inflamatoria. Evaluando los neutrófilos y los monocitos, denotamos un marcado aumento para la cepa **GP91phox K.O** lo cual está estrechamente vinculado a los datos previamente mencionados. Para profundizar en este resultado, según la evidencia previamente citada, determinamos el índice monocito/linfocito y neutrófilo/linfocito tanto para el conteo como para su valor porcentual, denotando un marcado aumento del índice en los ratones **GP91phox K.O** (Figura 25C).

Este primer abordaje inicial sugiere que la ausencia de la NADPH oxidasa con la posible consecuente disminución de ROS agrava los signos clínicos y la severidad de la artritis, se acompaña de una respuesta inflamatoria sistémica de mayor entidad y puede estar mediada por células de la inmunidad innata como neutrófilos o macrófagos.

Objetivo 4. Caracterizar la población de pacientes en estudio incluyendo datos demográficos, posibles variables confusoras y para los pacientes aspectos relevantes de su enfermedad.

A continuación, investigamos el papel de las ROS macrofágicas en pacientes con AR. En primer lugar, es mandatorio describir nuestra muestra de participantes dentro del módulo clínico del estudio. Contamos con un total de 56 participantes divididos en un grupo de **CONTROLES** (29 participantes) y un grupo de **PACIENTES** con AR establecida (27 participantes).

La caracterización descriptiva de ambos grupos está resumida en la Tabla 10. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre la media de edad de ambos grupos. El grupo de **PACIENTES** tuvo una media de edad 8 años mayor respecto a los **CONTROLES** (47 vs 55). Respecto a las comorbilidades, hubo una mayor prevalencia de hipertensión arterial y asma en el grupo de **PACIENTES**.

Tabla 10. Caracterización descriptiva de pacientes y controles					
Variables descriptivas ¹	Controles (n=29)	Pacientes AR (n=27)	Test	Valor p	Resumen
Sexo					
Femenino ♀	28 (96.5%)	24 (88.9%)	X ²	0.3434	ns
Masculino ♂	1 (3.5%)	2 (11.1%)	X ²	0.6045	ns
Etnia					
Blanca	25 (86.2%)	18 (66.7%)	X ²	0.1165	ns
Mestiza	3 (10.3%)	8 (29.6%)	X ²	0.0965	ns
Afrodescendiente	1 (3.5%)	1 (3.7%)	X ²	1	ns
Edad [MEDIA - (SD) años]	47 (10.6)	55 (11.1)	No paramétrico	0.001	**
Peso [MEDIA - (SD) kg]	71.7 (16.1)	72.3 (15.7)	Paramétrico	0.8656	ns
Altura [MEDIA - (SD) m]	1.63 (0.07)	1.59 (0.08)	Paramétrico	0.7985	ns
IMC [MEDIA - (SD) kg/m ²]	26.9 (6.9)	28.9 (6.4)	No paramétrico	0.135	ns
Sobrepeso	5 (17.2%)	7 (25.9%)	X ²	0.5255	ns

Obesidad	9 (31.0%)	12 (44.4%)	X ²	0.4088	ns
Sedentarismo	12 (41.3%)	16 (59.3%)	X ²	0.2847	ns
Comorbilidades					
Tabaquismo					
Si	7 (24.2%)	7 (25.9%)	X ²	1	ns
Extabaquista	11 (37.9%)	10 (37.0%)	X ²	1	ns
Hipertensión Arterial	7 (24.2%)	16 (59.3%)	X ²	0.0137	*
Diabetes Mellitus	4 (13.8%)	4 (14.8%)	X ²	1	ns
Hipercolesterolemia	6 (20.7%)	10 (37.0%)	X ²	0.2397	ns
Distiroidismo	7 (24.2%)	9 (33.3%)	X ²	0.5577	ns
Hipotiroidismo	7 (100%)	7 (77.8%)	X ²	1	ns
Hipertiroidismo	0 (0%)	2 (22.2%)	X ²	1	ns
Tto farmacológico	6 (85.7%)	9 (100%)	X ²	1	ns
EII	0 (0%)	0 (0%)	-	-	-
Asma	1 (3.4%)	7 (25.9%)	X ²	0.0227	*

Tabla 10. Caracterización descriptiva de pacientes y controles. Variables sociodemográficas y antecedentes personales relevantes. ¹ Las variables son expresadas como n (%) a no ser que sea especificado lo contrario. ns - no significativo, * p < 0.05, **p < 0.01..

A modo de poder valorar posibles variables confusoras, dentro del formulario sociodemográfico y la evaluación clínica se evidenciaron los antecedentes familiares (AF) de EAS, la presencia de fibromialgia asociada, patología articular no inflamatoria, artrosis y el trabajo manual (Tabla 11). Casi la mitad de los **PACIENTES** con AR presentó AF de EAS, y fibromialgia asociada. No denotamos diferencias significativas entre los grupos para las variables patología articular, artrosis y trabajo manual.

Tabla 11. Estudio de posibles variables confusoras en pacientes y controles¹				
Variables Confusoras	Controles (n=29)	Pacientes AR (n=27)	Valor p	Resumen
AF de EAS	1 (3.4%)	11 (40.7%)	0.0002	***
Fibromialgia	2 (6.8%)	14 (51.8%)	<0.0001	****

Patología articular	12 (41.4%)	8 (29.6%)	0.1789	ns
Artrosis	8 (66.7%)	8 (100%)	0.4328	ns
Trabajo Manual	21 (72.4%)	14 (51.8%)	0.2246	ns

Tabla 11. Evaluación de variables confusoras. ¹ Las variables son expresadas como n (%). X²: ns - no significativo, *** < 0.001, **** < 0.0001.

Dentro de las variables descriptivas a destacar, las mismas se encuentran tabuladas en la Tabla 12. La media de tiempo de evolución de la enfermedad fue de 13 años. Desde un punto de vista metodológico, esto podría haber correspondido a un sesgo de selección, el cual se vio sorteado categorizando a los **PACIENTES** por la variable *score de actividad*. A destacar sobre esta primera variable, no hubo diferencias significativas en la media de tiempo de evolución de la enfermedad entre los grupos según la actividad de la enfermedad.

Dos de las pacientes no se encontraban recibiendo tratamiento farmacológico por opción personal y al momento de la evaluación clínica se encontraban con alta actividad de la enfermedad. El solapamiento más frecuente fue con LES, encontrándose la totalidad de las **PACIENTES** con AR/LES tratadas con Hidroxicloroquina.

Tabla 12. Tratamientos y solapamientos de pacientes	
Variables Descriptivas	Pacientes AR (n=27)
Tiempo Evolución [MEDIA - (SD) años]	13.0 (7.9)
Tratamiento	25 (86.2%)
FAMES	19 (76%)
Metotrexate	9 (47.4%)
Leflunomida	9 (47.4%)
Sulfasalazina	1 (5.3%)
Biológicos	14 (56.0%)
Rituximab	3 (21.4%)
Adalimumab	5 (37.1%)

Infliximab	0 (0%)
Etanercept	0 (0%)
Tocilizumab	3 (21.4%)
Sintéticos dirigidos - Inh. JAK	3 (11.1%)
Prednisona	7 (28.0%)
Solapamiento	14 (51.9%)
LES	8 (57.1%)
Tratamiento con HXQ	8 (100%)
SS	5 (35.7%)
SAAF	1 (7.1%)
ES	0 (0%)
Vasculitis	2 (14.3%)
Otra	5 (35.7%)

Tabla 12. Variables relacionadas a la enfermedad en pacientes con AR

¹ Las variables son expresadas como n (%) a no ser que sea especificado lo contrario. Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAMES), SD (desvío estándar), Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Hidroxicloroquina (HXQ), Síndrome de Sjogren (SS), Síndrome de Anticuerpos Anti Fosfolípidos (SAAF), Esclerosis sistémica (ES).

Posteriormente, profundizamos en la caracterización de los **PACIENTES** en función al score de actividad de la enfermedad (Tabla 13). Utilizamos los dos scores de actividad detallados en la introducción, primariamente el CDAI para luego de obtener los resultados de la PCR y profundizar en el DAS28. La Tabla 13 muestra la categorización de los pacientes según los dos scores de actividad clínica, clasificados en cuatro categorías: **remisión**, **baja actividad**, **moderada actividad**, **alta actividad**. Además, se detallan las características asociadas al tiempo de evolución de la enfermedad, la frecuencia relativa de los pacientes en cada categoría y los tratamientos recibidos, incluyendo el solapamiento con otras enfermedades.

En cuanto al CDAI, como esperable, se observa un aumento progresivo del promedio del índice, desde 1.5 (± 0.5) en pacientes en **remisión** hasta 32.3 (± 5.9) en aquellos con **alta actividad** de la enfermedad. La frecuencia relativa también se incrementa en las categorías de mayor actividad, con un 23.0 % de los pacientes en **remisión**, un 15.4 % en **baja actividad**, un 26.9 % en **moderada actividad** y un 34.6 % en **alta actividad**, siendo esta última la categoría más representada. El tiempo de evolución

de la enfermedad sigue una tendencia similar, con un promedio de 10.5 (± 5.9) años en **remisión** y 14.6 (± 7.8) años en **alta actividad**.

El promedio del DAS28 aumenta desde 0.93 (± 0.50) en **remisión** hasta 8.61 (± 2.4) en **alta actividad**. La distribución porcentual muestra que el 30.8 % de los pacientes se encuentra en **remisión**, mientras que el 38.5 % presenta **alta actividad**, confirmando que esta última es la categoría predominante.

Respecto a los tratamientos, se identifica que los pacientes con **remisión** reciben predominantemente monoterapia con FAME ($n = 3 - 50\%$) o biológicos ($n = 2 - 33.3\%$), mientras que aquellos con **moderada** y **alta actividad** tienden a recibir combinaciones de FAME y biológicos, con una prevalencia del 71.4 % ($n = 5$) en **moderada actividad** y del 33.3 % ($n = 3$) en **alta actividad**. En contraste, el 22.2 % ($n = 2$) de los pacientes con **alta actividad** no recibe tratamiento.

El solapamiento con otras enfermedades, principalmente el LES, se observa en todas las categorías, siendo más frecuente en pacientes con **alta actividad**.

No fue realizado un análisis estadístico para cada subgrupo de actividad por el bajo número de participantes por grupo; de todos modos, los tratamientos fueron considerados para los análisis posteriores, excluyendo por ejemplo, a las pacientes en tratamiento con anti-TNF α en el análisis estadístico de la determinación de concentración de TNF α en plasma y su comparación con el grupo control.

Categorización de pacientes según scores de actividad					
Variable	Categoría CDAI	En remisión	Baja actividad	Moderada actividad	Alta actividad
CDAI Promedio [MEDIA (SD)]		1.5 (0.5)	6.75 (2.2)	10.4 (3.6)	32.3 (5.9)
Frecuencia relativa		6 (23.0%)	4 (15.4%)	7 (26.9%)	9 (34.6%)
Tiempo de evolución [MEDIA - (SD) años]		10.5 (5.9)	12.75 (11.7)	14.3 (7.1)	14.6 (7.8)
Variable	Categoría DAS 28	En remisión	Baja actividad	Moderada actividad	Alta actividad
DAS 28 Promedio [MEDIA (SD)]		0.93 (0.50)	2.87 (0.25)	4.175 (0.58)	8.61 (2.4)
Frecuencia relativa		8 (30.8%)	3 (11.5%)	5 (19.2%)	10 (38.5%)
Tratamientos					

Categorización de pacientes según scores de actividad					
Variable	Categoría CDAI	En remisión	Baja actividad	Moderada actividad	Alta actividad
CDAI Promedio [MEDIA (SD)]		1.5 (0.5)	6.75 (2.2)	10.4 (3.6)	32.3 (5.9)
Frecuencia relativa		6 (23.0%)	4 (15.4%)	7 (26.9%)	9 (34.6%)
Solo FAME		3 (50%)	1 (25.0%)	1 (14.3%)	4 (44.4%)
Solo Biológico		1 (16.7%)	1 (25.0%)	1 (14.3%)	0 (0.0%)
FAME + Biológico		1 (16.7%)	1 (25.0%)	4 (71.4%)	2 (22.2%)
Solo Sintético		0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (14.3%)	0 (0.0%)
FAME + Sintético		0 (0.0%)	1 (25%)	0 (0.0%)	1 (11.1%)
Sin tratamiento		1 (16.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (22.2%)
Solapamiento		1 (16.6%)	2 (50%)	4 (57.1%)	6 (66.6%)

Tabla 13. Caracterización y categorización de los pacientes según score de actividad. ¹ Las variables son expresadas como n (%) a no ser que sea especificado lo contrario. *Clinical Disease Activity Index* (CDAI), *Disease Activity Score* 28 (DAS28), Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAMES), SD (desvío estándar).

En síntesis, la población de estudio incluyó 56 participantes, divididos en un grupo de **CONTROLES** (n=29) y **PACIENTES** con AR establecida (n=27), excluyendo una paciente por no cumplir con criterios clasificatorios. Ambos grupos fueron comparables en variables sociodemográficas, excepto por la edad, mayor en **PACIENTES** con AR (55 vs 47 años; p=0.001). Los **PACIENTES** mostraron alta prevalencia de AF de EAS y fibromialgia. El tiempo promedio de evolución de la AR fue de 13 años, y la mayoría recibió tratamiento con FAMES o biológicos, siendo frecuentes los solapamientos con LES. Según los scores de actividad CDAI y DAS28, el 38.5% presentó **alta actividad**, asociada a mayor tiempo de evolución y menor uso de monoterapia. Se identificaron barreras de acceso al tratamiento en algunos casos, destacando su impacto en el manejo clínico.

Objetivo 5. Determinar y correlacionar variables proinflamatorias humorales y celulares en pacientes con AR vinculando las mismas con la actividad de la enfermedad.

Del mismo modo que en el modelo murino, el abordaje celular inicial de la respuesta inmunológica se realizó a través de un hemograma básico determinado por tamaño y

volumen en un equipo automatizado. En la Figura 26A se observa el primer abordaje de las tres series: eritroide, leucocitaria y plaquetaria.

No encontramos diferencias en la concentración de hemoglobina ni una tendencia a la disminución en los **PACIENTES** con respecto a los **CONTROLES** (Figura 26A).

Analizando las diferentes poblaciones leucocitarias (Figura 26B), denotamos una disminución significativa del número y porcentaje de linfocitos circulantes en los **PACIENTES**, aunque no se correspondió con una linfopenia patológica.

Por otro lado observamos un aumento en el número y porcentaje de neutrófilos y monocitos en los **PACIENTES** con respecto a los **CONTROLES** (Figura 26B). Para abordar estos resultados en profundidad, determinamos el índice monocito/linfocito y neutrófilo/linfocito para su valor porcentual, denotando un marcado aumento del índice en los **PACIENTES** (Figura 26C) para ambos ratios.

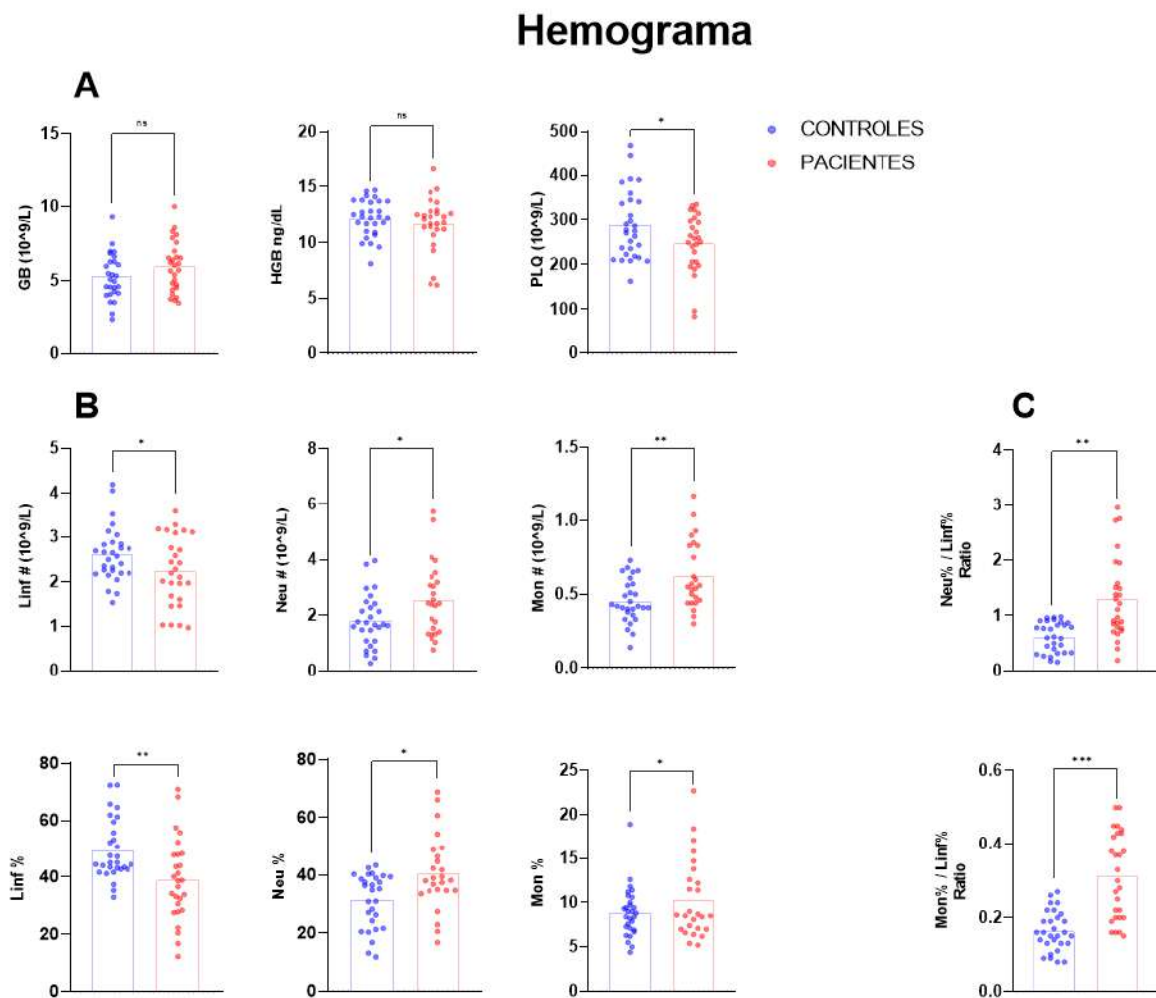


Figura 26. Resultados del hemograma básico realizado en equipo automático por tamaño, comparación **CONTROLES** y **PACIENTES**. **A** - Abordaje primario de las tres series principales. **B** - Número y porcentaje de las principales series leucocitarias. **C** -

Coeficientes de monocitos y neutrófilos en función de linfocitos. GB (glóbulos blancos), HGB (hemoglobina), Plq (plaquetas), Linf (linfocitos), Neu (neutrófilos), Mon (monocitos), Mon/Linf (Ratio Monocito-Linfocito MLR), Neu/LINF (Relación Neutrófilo-Linfocito NLR). Si la distribución fue normal, se realizó test t de student, si la distribución no fue normal se realizó Mann Whitney test: ns - no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

A modo de determinar si estos índices se relacionan con la actividad de la enfermedad graficamos el valor de los índices en función de la categorización según el DAS28 (Figura 27). Encontramos una clara tendencia al aumento según la actividad, siendo estadísticamente significativa la diferencia entre los **PACIENTES** cuya actividad fue catalogada como alta respecto a los pacientes en **remisión** y a los **CONTROLES**, los cuales se comportan de forma similar para el NLR y el MLR.

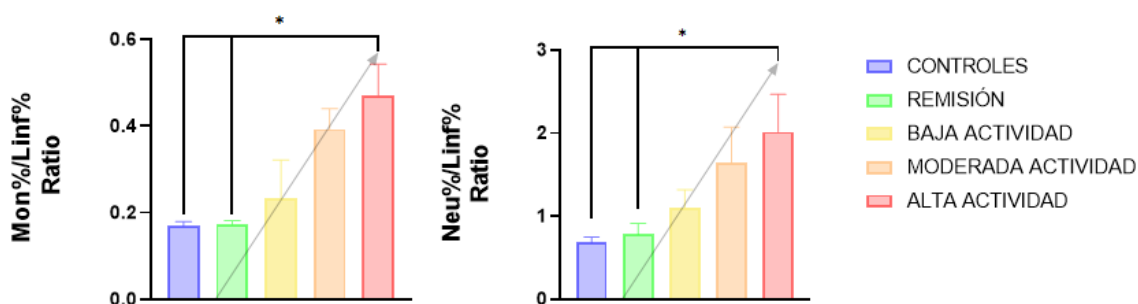


Figura 27. Determinación de la tendencia de variabilidad de los ratios MRL % y NLR % en función de la categorización de la actividad de la enfermedad como remisión, baja actividad, moderada actividad, alta actividad y los valores determinados para los CONTROLES. ANOVA y Mann-Whitney U test: ns - no significativo, * $p < 0.05$.

Con el objetivo de validar las variables cualitativas como número de articulaciones dolorosas o articulaciones tumefactas, se graficaron en función de la actividad de la enfermedad DAS28 (Figura 28A). En sintonía con lo previamente mencionado, comparando los valores de PCR sérica para ambos grupos, se determinó una marcada diferencia en la media de los valores obtenidos, siendo, como esperado, estadísticamente mayor la concentración obtenida para los **PACIENTES** que en los individuos **CONTROLES** (Figura 28B). Para culminar con la validación de determinados parámetros de evaluación clínica, evidenciamos una marcada correlación positiva entre la concentración sérica de PCR con el score de actividad CDAI (recordando que el CDAI no abarca parámetros humorales).

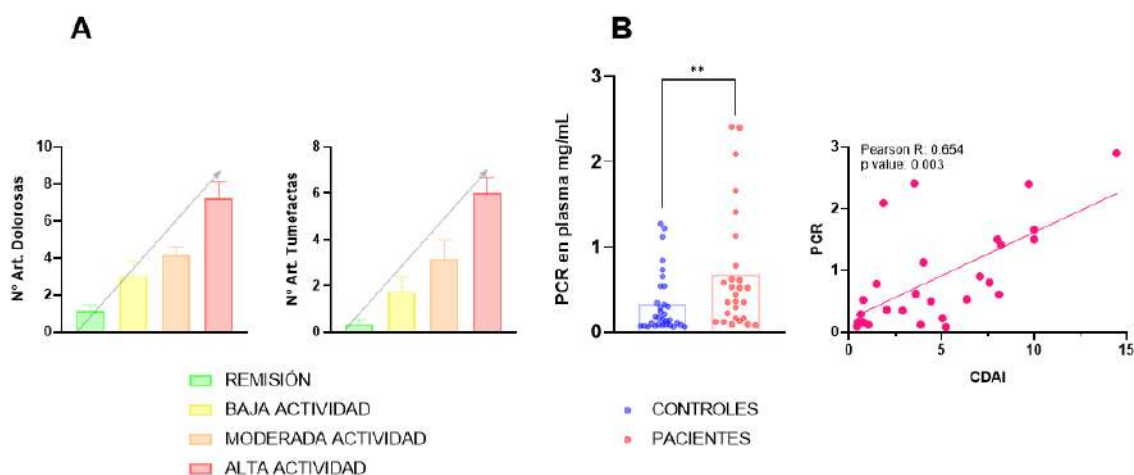


Figura 28 A - Validación rápida de variables cualitativas como el número de articulaciones dolorosas y tumefactas en función de la actividad determinada por el score de actividad CDAI como **remisión**, **baja actividad**, **moderada actividad**, **alta actividad**. **B** - Comparación entre los valores de PCR sérica entre **CONTROLES** y **PACIENTES**. Mann-Whitney U test: ns - no significativo, ****** $p < 0.01$. Correlación entre los valores de PCR sérica de pacientes y el score de actividad CDAI. Correlación de Pearson.

Para complementar la evaluación de los parámetros inmunológicos, se determinó la concentración de ocho citoquinas en plasma para ambos grupos (Figura 29). La selección de las citoquinas estudiadas se realizó en base a los reactivos disponibles en el laboratorio: IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF α e IL-12p70 (pro-inflamatorias) y TGF- β , IL-10 (anti-inflamatorias). Dentro de las citoquinas proinflamatorias, obtuvimos mayores niveles de IL-6, IL-1 β e IL-8 en el grupo de **PACIENTES**. Sorpresivamente, la concentración de TNF α fue muy similar entre los grupos, incluso al excluir del análisis a los 5 **PACIENTES** que se encontraban recibiendo inmunoterapia con un anticuerpo monoclonal anti-TNF α (*datos no mostrados*). Para la evaluación de citoquinas antiinflamatorias se determinó la concentración de IL-10 y TGF- β , demostrando un marcado descenso únicamente para TGF- β en los **PACIENTES**. Por último, tanto IL-12 e IL-2 presentaron menores niveles en el grupo de **PACIENTES** respecto a los **CONTROLES**, posiblemente en relación a una respuesta compensatoria.

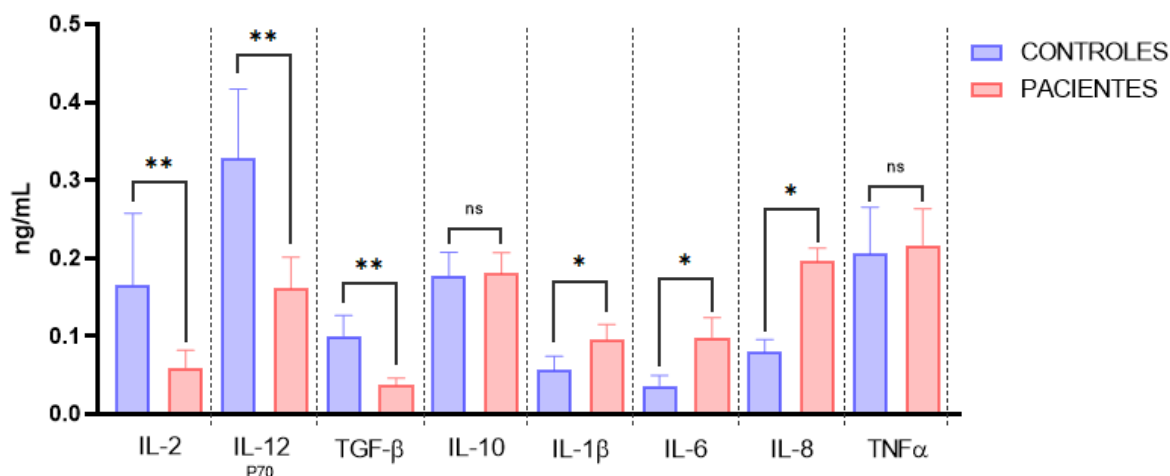


Figura 29. Determinación de citoquinas en plasma de PACIENTES y CONTROLES. La concentración de citoquinas en plasma se determinó por ELISA sandwich. Mann-Whitney U test: ns - no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Se pueden ver evidenciados dos comportamientos claramente diferentes para dos citoquinas proinflamatorias como lo son IL-6 e IL-8 (Figura 30). En el caso de IL-6 es ampliamente evidenciado en la literatura la clara relación positiva de su concentración en plasma con la actividad de la enfermedad (109). En este sentido es que se evidencia un claro aumento de la concentración a medida que aumenta la actividad de la enfermedad, tanto de forma categórica (Figura 30), como en la evaluación de la correlación (*datos no mostrados*). En cambio, esto no sucede para IL-8, obteniendo concentraciones similarmente altas en todos los pacientes, independientemente de los grupos de actividad, no demostrando una clara correlación con los scores de actividad (*datos no mostrados*), por lo que solo podemos comparar los pacientes en **actividad** con los pacientes en **remisión** y los **CONTROLES** (Figura 30). Es importante destacar, que en ambos casos los pacientes en **remisión** se comportan del mismo modo que los **CONTROLES**. En el caso de TNFα, según la bibliografía, esperábamos encontrar un comportamiento similar a la IL-6, pero sorprendentemente el coeficiente de correlación de Pearson fue de 0.456 con un valor p mayor a 0.06 (*datos no mostrados*). Del mismo modo, el TGF-β tiene un comportamiento similar al de la IL-8 pero en el escenario opuesto al tratarse de una citoquina anti-inflamatoria, denotando niveles mayores en los controles y los pacientes en remisión en comparación con los pacientes en actividad (*datos no mostrados*).

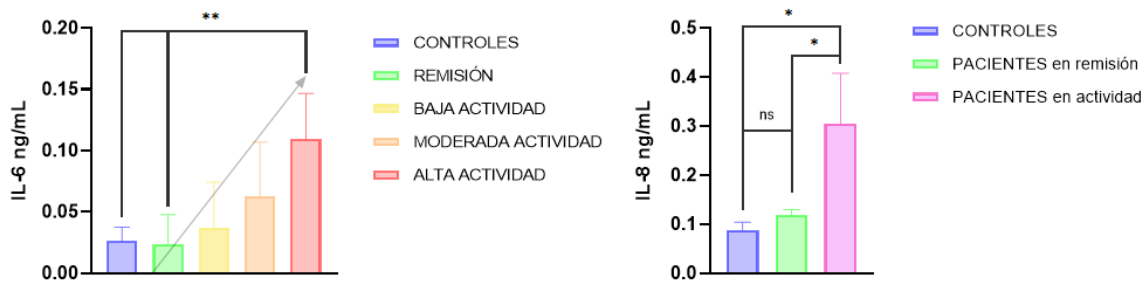


Figura 30. Evaluación del comportamiento de la concentración sérica de IL-6 e IL-8 según los grupos de actividad determinados por el score de actividad DAS28 o comparando aquellos **pacientes en remisión** con los **pacientes en actividad**. Para ambas se realizó primero un test de ANOVA y posteriormente Mann-Whitney U test: ns - no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Para profundizar en los resultados evidenciados de forma inicial a través del hemograma, diseñamos un abordaje que nos pudiera facilitar la caracterización de la respuesta inmune celular, tanto innata como adaptativa, con un foco en la población monocítica. Dado que no es posible ni es éticamente correcto acceder a muestra en articulación en Uruguay, el abordaje se realizó por el estudio de las poblaciones celulares mononucleares circulantes en sangre periférica (PBMC).

Como se mencionó en la introducción, la población de monocitos clásicos suele encontrarse en circulación en condiciones basales; un monocito atípico suele considerarse más activo en respuestas inflamatorias crónicas y los monocitos no clásicos tienen un rol dual en las respuestas inflamatorias crónicas dependientes de la intensidad de la respuesta.

Posterior a la purificación de PBMCs de sangre periférica, se seleccionaron las poblaciones de: monocitos clásicos $CD14^{high} CD16^{-}$, monocitos intermedios $CD14^{high} CD16^{+}$ y monocitos no clásicos $CD14^{intermedio} CD16^{high}$. A modo de ejemplo se muestra la estrategia de *gating* realizado en la citometría de flujo basándonos en las tres poblaciones en la Figura 31. En nuestros ensayos no denotamos una población $CD14^{high}$ o $CD14^{intermedia}$ por lo cual determinamos únicamente las poblaciones tomando como referencia el $CD14^{+}$.

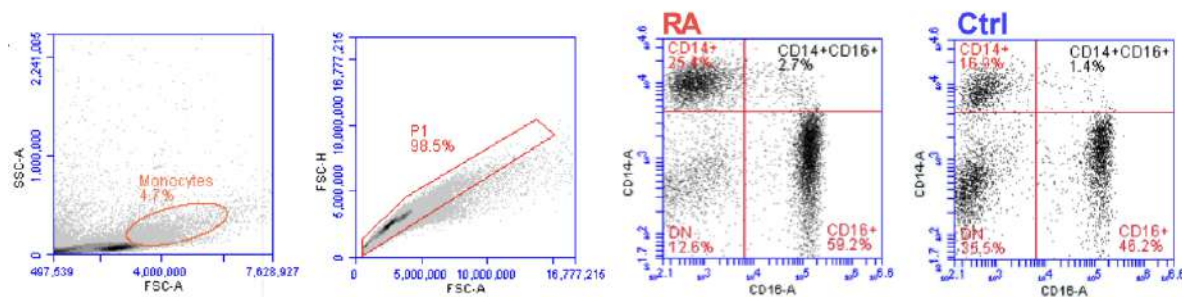


Figura 31. Estrategia de gating para la selección de diferentes subpoblaciones de monocitos en PBMC. **Plot 1** - SSC-A en función de FSC-A donde se observa un patrón clásico de PBMCs de sangre periférica humana, en **naranja** se evidencia la gate marcada como **Monocitos**. **Plot 2** - FSC-H en función de FSC-A para seleccionar singuletes. **Plot 3 y 4** - Marcación de las tres poblaciones **CD14⁺**, **CD16⁺** y **CD14⁺CD16⁺**.

En primer lugar, y en concordancia con los resultados evidenciados en el hemograma, se determinó el número de eventos por microlitro de las tres poblaciones tanto para las muestras derivadas de pacientes como de controles (Figura 32A). Respecto a los marcadores de actividad proinflamatoria, las poblaciones CD14⁺ y CD16⁺ en **PACIENTES** presentaron un mayor nivel de ROS evidenciado por la oxidación de la sonda DHR123 (Figura 32B). De forma contraria, la población doble positiva presentó menores niveles de ROS en **PACIENTES**. De forma sorpresiva, para el receptor de la citoquina proinflamatoria TNFα (CD120) no se encontraron diferencias significativas al medir la Media de Fluorescencia (MFI) y compararla entre los grupos para las tres poblaciones (Figura 32C). En concordancia con los resultados obtenidos en el modelo murino, detectamos menores niveles de HO-1 en las poblaciones CD14⁺ y CD16⁺ provenientes de los PBMCs de sangre periférica de los **PACIENTES** (Figura 32D). En concordancia con los niveles de ROS detectados, la expresión de HO-1 en la población CD14⁺CD16⁺ fue considerablemente mayor en los **PACIENTES** comparando con los **CONTROLES**.

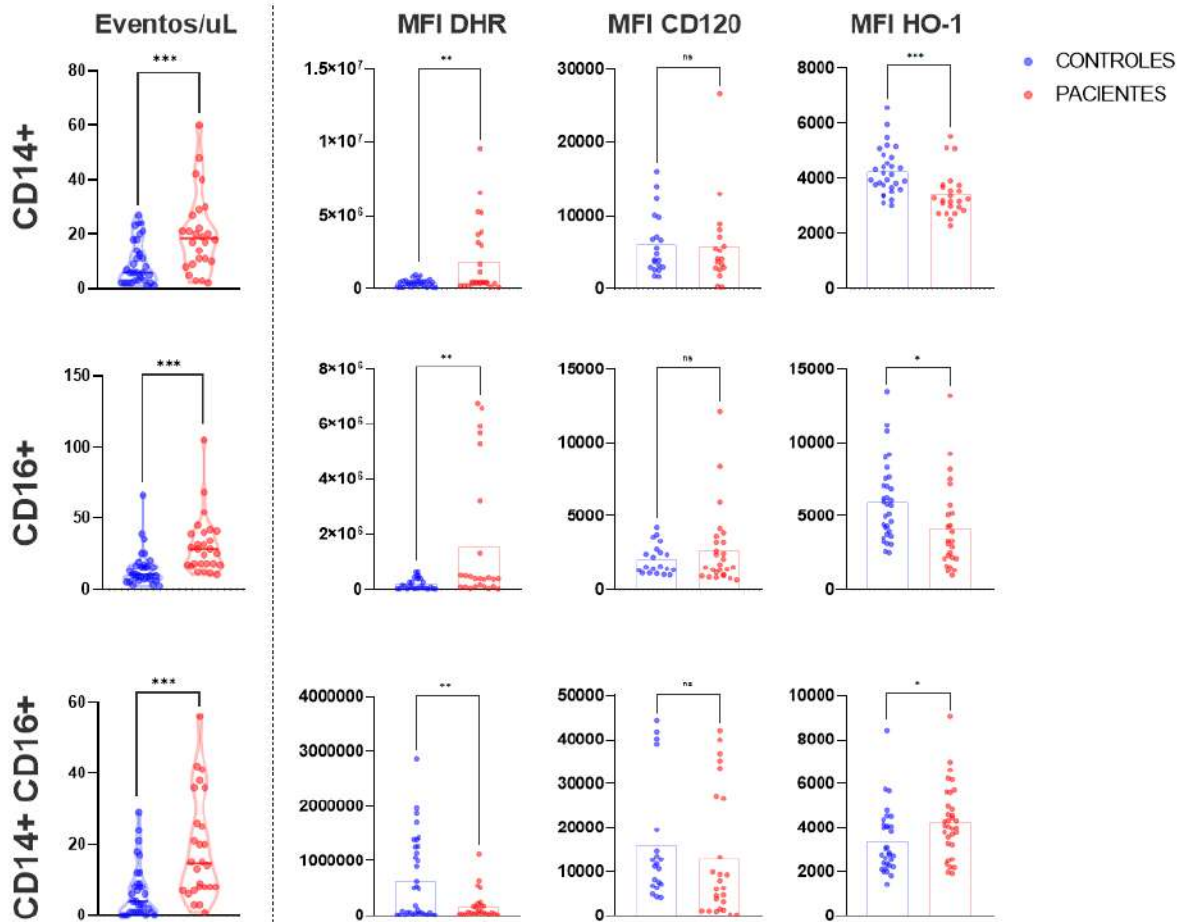


Figura 32. Caracterización de poblaciones monocíticas provenientes de la purificación de PBMCs de PACIENTES y CONTROLES. **A** - Conteo de eventos/μL para las tres poblaciones. **B** - Expresión de ROS por MFI (determinada con la sonda DHR123), **C** - MFI de CD120 y **D** - MFI de HO-1; para las tres poblaciones de interés. Test t de student o Mann-Whitney test: ns - no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Ejemplos de los histogramas de MFI para las tres moléculas de interés pueden verse en la Figura 33.

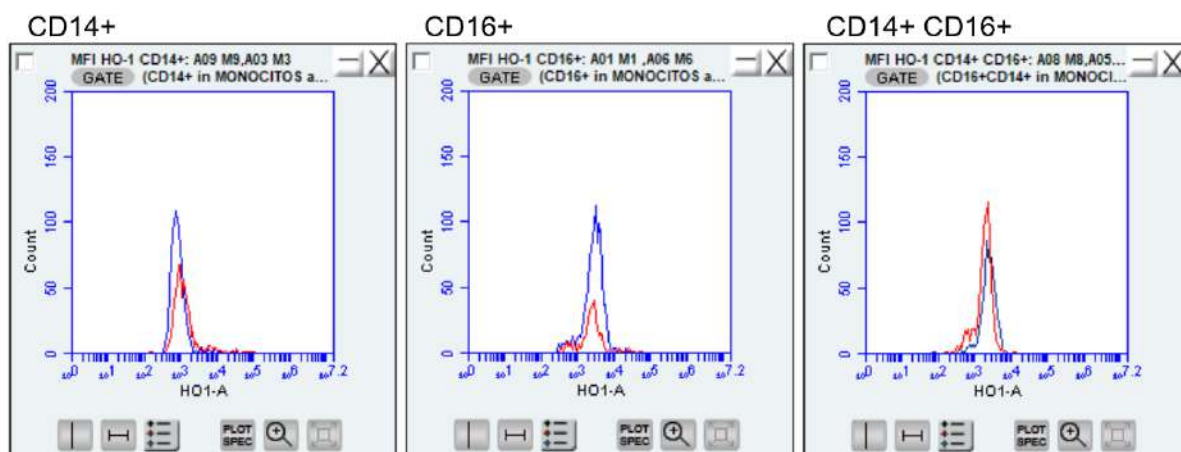


Figura 33. Ejemplos de histogramas de MFI para HO-1 en las tres poblaciones celulares estudiadas, CD14⁺, CD16⁺ y CD14⁺CD16⁺. En azul se representan los **CONTROLES** y en rojo los **PACIENTES**.

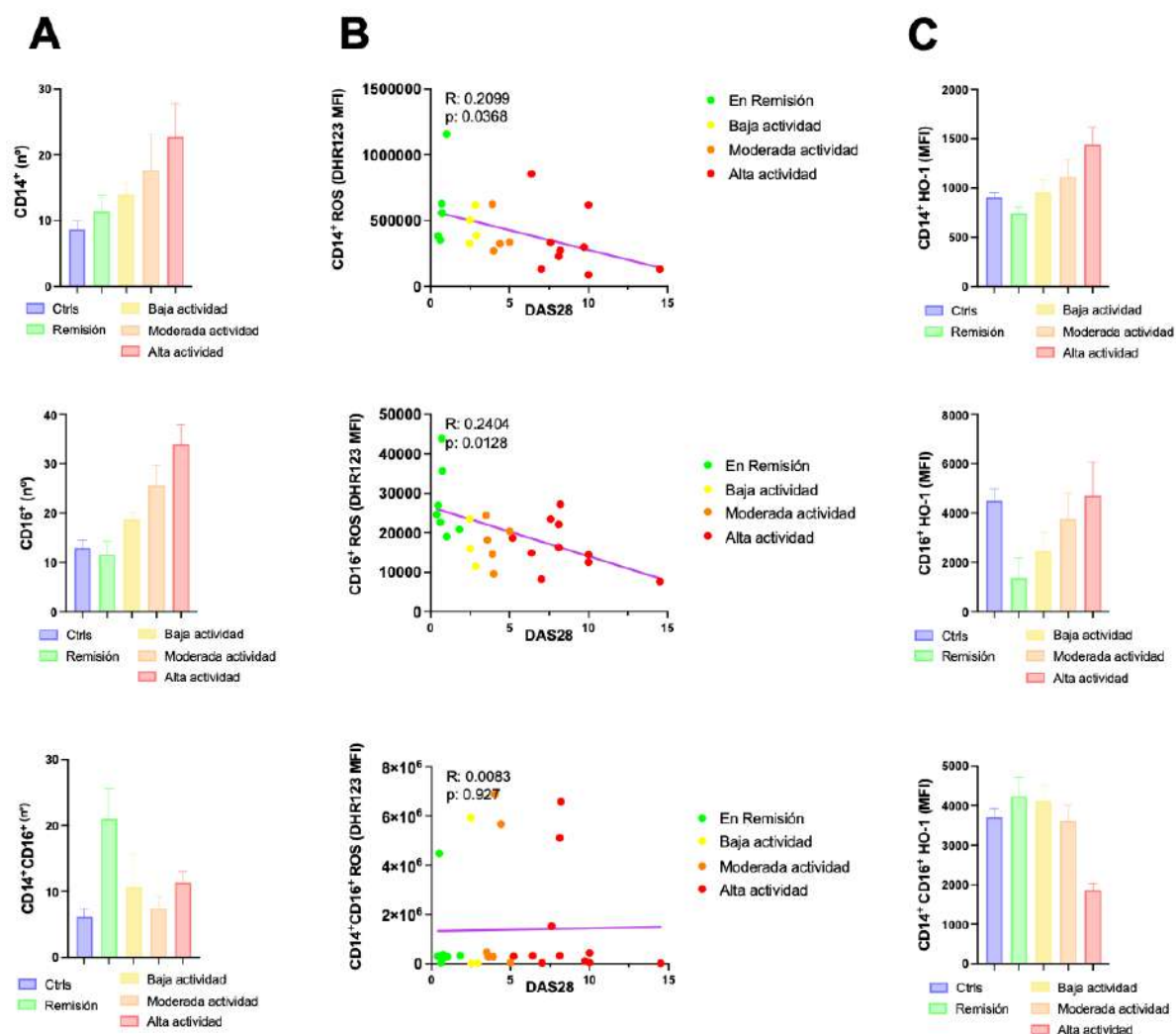


Figura 34. Relación entre parámetros celulares, inflamatorios y anti-inflamatorios según clasificación de actividad de la enfermedad. **A)** Número de subpoblaciones

de monocitos según la actividad de la enfermedad. **B)** Correlación de la producción de ROS con el DAS28. **C)** Expresión de HO-1 en diferentes subconjuntos de monocitos según la actividad de la enfermedad. Prueba de correlación de Pearson.

A continuación y dado el marcado perfil diferencial entre pacientes y controles, buscamos vincular estos parámetros celulares con la actividad de la enfermedad en los **PACIENTES**. Como era esperable, el número de células $CD14^+$ y $CD16^+$ aumentó con la actividad de la enfermedad distribuida por subgrupos (Figura 34A), mientras que el número de células $CD14^+ CD16^+$ no tuvo un claro patrón de relación con la actividad de la enfermedad, mostrando su carácter funcional diferencial a las otras dos poblaciones (Figura 34A). Del mismo modo y de forma complementaria la producción de ROS por las células $CD14^+$ y $CD16^+$ se correlacionó negativamente con la actividad de la enfermedad (Figura 34B) mas no fue evidenciado una asociación numérica para la población $CD14^+ CD16^+$. La expresión de la enzima antioxidante HO-1 aumentó con la actividad de la enfermedad en estos dos subconjuntos celulares (Figura 34C), lo que indica un comportamiento opuesto al de los niveles de ROS posiblemente asociado a una respuesta compensatoria.

Por último, se determinaron las poblaciones linfocitarias circulantes. La estrategia de selección de la población linfocitaria se evidencia en la Figura 35. Se seleccionaron las poblaciones de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$.

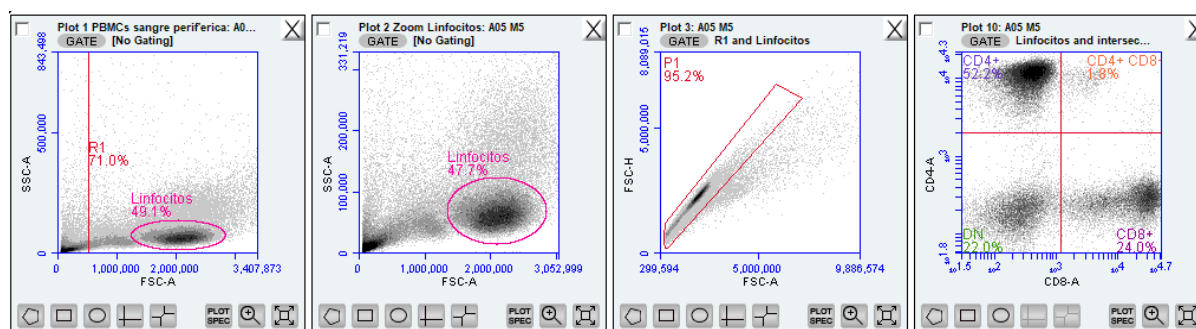


Figura 35. Estrategia de gating para la identificación de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$.

Plot 1 - SSC-A en función de FSC-A donde se observa un patrón clásico de PBMCs, en **rosado** se evidencia la gate marcada como **Linfocitos**. **Plot 2** - SSC en función de FSC-A donde se evidencian de forma más clara la única “nube” correspondientes a la población **linfocitarias**. **Plot 3** - FSC-H en función de FSC-A para seleccionar singuletes. **Plot 4** - Marcación de las dos poblaciones previamente descritas, **$CD4^+$ en violeta** y **$CD8^+$ en rosa oscuro**.

No se detectaron diferencias en el número o frecuencia de las poblaciones $CD4^+$ y $CD8^+$ en sangre periférica de los **PACIENTES** respecto a los **CONTROLES** (Figura 36). Evaluando el factor de transcripción clave para la diferenciación en células

colaboradoras CD4⁺ Th1 y citotóxicas CD8⁺ se determinó la expresión intracelular de Tbet utilizando un anticuerpo específico, evidenciándose, como era esperable, un aumento de su expresión tanto en CD4⁺ como en CD8⁺.

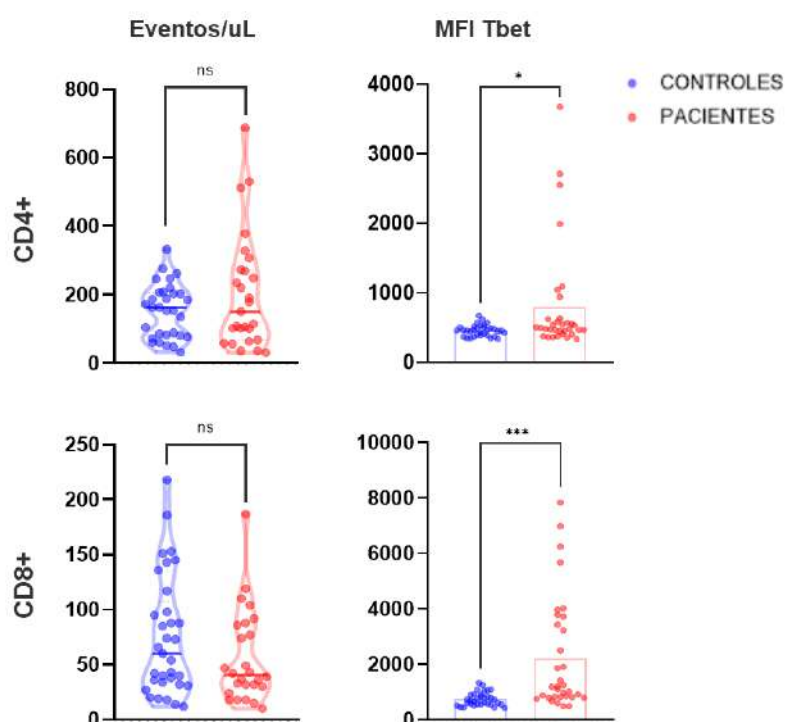


Figura 36. Evaluación de poblaciones linfocíticas provenientes de la purificación de PBMCs de pacientes y controles. Conteo de eventos/ μL para las dos poblaciones CD4⁺ y CD8⁺. MFI para la expresión intracelular de Tbet. Test t de student o Mann-Whitney test: ns - no significativo, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

En conjunto, estos resultados nos permiten confirmar aspectos inflamatorios asociados a la AR, caracterizar las poblaciones monocitarias circulantes y asociar aspectos inflamatorios de la inmunidad celular innata con una tendencia a la disminución de estas poblaciones celulares y sus parámetros inflamatorios frente a una enfermedad más activa.

Discusión y Perspectivas

En este trabajo se analiza la respuesta inflamatoria asociada a la AR tanto a nivel sistémico como articular, centrándose en el papel de los monocitos y macrófagos, la producción de especies ROS y la expresión de HO-1. Para ello, se utilizaron dos enfoques: un modelo experimental murino de CIA y un estudio clínico en pacientes con AR, con especial énfasis en su relación con la actividad de la enfermedad. Se puso a punto un modelo murino de CIA para describir la respuesta inmune inflamatoria y se caracterizaron las poblaciones monocitarias circulantes y macrofágicas sinoviales. Además, se exploró el rol de las ROS en el desarrollo y

actividad de la artritis en un modelo con deficiencia de GP91phox, evaluando sus implicancias clínicas y humorales. Paralelamente, en pacientes con AR, se describieron características demográficas y variables relevantes de la enfermedad, con el objetivo de correlacionar la producción de ROS y otros mediadores inflamatorios con la actividad de la enfermedad, proporcionando una visión integral de los mecanismos inflamatorios implicados.

A continuación destacaremos los aspectos más relevantes de este trabajo, los cuales serán abordados en el mismo orden que fueron presentados en este trabajo. Por último, proponemos diferentes perspectivas que derivan de esta tesis.

Durante este trabajo fuimos capaces de poner a punto exitosamente el modelo de CIA en ratones, el cual resultó ser largo y complejo. Destacamos la marcada severidad del modelo, la cual nos requirió realizar varias tandas de ratones (seis) asociado a la resistencia de la cepa. Si bien, la cepa C57/BL6 es catalogada como resistente, el modelo fue exitoso y nos permitió cumplir con los objetivos propuestos. De ser posible, en caso de realizar nuevos ensayos con un modelo murino, es una alternativa favorable utilizar los ratones con un genotipo DBA1 en los cuales la incidencia de artritis posterior a la inmunización es del 98-100% y con un índice de severidad menor [\(110\)](#).

Respecto a la evaluación de la inmunidad humoral adaptativa, inicialmente seguimos un enfoque sugerido por Chondrex, Inc. para validar el modelo. Este modelo se basa en la formación de anticuerpos contra el colágeno tipo II de gallina, cuya especificidad incluye epítopes compartidos con el colágeno murino, desencadenando funciones efectoras a través de la unión antígeno-anticuerpo. Interesantemente denotamos que la respuesta humoral tiene un rol clave en el vínculo con la severidad de la artritis en el modelo inicial, por lo cual decidimos profundizar en la avidéz de estos anticuerpos en el modelo gp91phox K.O. El aumento de la avidéz podría estar vinculado a la severidad de la enfermedad, pero no tiene un marcado vínculo con las especies reactivas del oxígeno. Sin dudas es uno de los hallazgos exploratorios más relevantes de este trabajo, siendo una perspectiva poder profundizar aún más en los diferentes determinantes de inmunogenicidad y el rol de las ROS en este contexto.

Si bien no hay estudios específicos que evalúen los cambios en la inmunogenicidad de los antígenos propios patológicos en la AR, un estudio evaluó específicamente el rol de las ROS en la formación de autoanticuerpos anti-ADN en el LES [\(111\)](#). La modificación del ADN por ROS aumentó significativamente su inmunogenicidad; el sistema Fe^{2+} y H_2O_2 produjo anticuerpos que reconocieron tanto el ADN nativo como el modificado. Los datos de este estudio sugieren que los diferentes métodos de producción de ROS generan perfiles distintos de antigenicidad e inmunogenicidad,

pero también que el ADN modificado por ROS podría desempeñar un papel en la formación de complejos inmunes impulsados por antígenos en el LES.

Otro estudio clínico enfocado en la relación entre las ROS y la patogenia de la AR realizó un ensayo de subgrupo no planificado evaluando la variación en los niveles de ROS dependiendo de la seropositividad de la AR (112). Al evaluar a los pacientes con AR según la seropositividad y seronegatividad del factor reumatoide, encontramos una diferencia significativa en la peroxidación lipídica, el estado antioxidante y el nivel de SOD entre ambos grupos, siendo mayor para el grupo seropositivo.

Destacamos como una carencia de este trabajo, que en el modelo clínico no realizamos un abordaje de la población linfocitaria B ni de la inmunidad humoral. Podríamos haber detectado las poblaciones linfocitarias B activadas circulantes y su fenotipo, así como un análisis más detallado de la producción de autoanticuerpos.

Avanzando en el estudio de la respuesta inmune adaptativa celular, realizamos ensayos de proliferación con células provenientes de ganglios linfáticos drenantes, inicialmente estimulándolas con colágeno tipo II de gallina (el mismo utilizado en la inmunización). No observamos un aumento en los niveles de IFN γ bajo esta condición, lo que podría explicarse, en principio, por la ausencia de células dendríticas capaces de procesar el colágeno y presentarlo adecuadamente a los linfocitos. En contraste, la estimulación se realizó de manera policlonal con anticuerpos anti-CD3/CD28. Es importante destacar que es poco probable que un linfocito T reconozca un antígeno soluble en un medio de cultivo, ya que requiere, casi exclusivamente, la presentación del antígeno cargado en moléculas de MHC. Si bien podría existir una población de linfocitos B que colabore con los linfocitos T activados por el mismo antígeno, el rol de los linfocitos B en la presentación de antígenos está enfocado en su propia maduración de la afinidad y cambio de clase, más que en dirigir la activación de los linfocitos T hacia un fenotipo particular. Además, dado que estos son linfocitos T foliculares, no se esperaría un aumento en la producción de IFN γ .

Por otro lado, no observamos una producción aumentada de TNF α en los casos de AR. Este hallazgo de bajos niveles de TNF α en plasma para ambos grupos es inesperado, ya que esta citoquina es clave en los procesos inflamatorios y se esperaría su aumento en modelos murinos de AR (113). Una posible explicación es que biológicamente, TNF α no sea la citoquina predominante en este modelo o que su producción sea transitoria y no se haya capturado al momento de la recolección de las muestras. No se encuentran publicados datos sobre la variación específica de esta citoquina y los tiempos de recolección de la muestra o su procesamiento.

Otro aspecto a destacar del primer modelo es la baja expresión de MHCII en macrófagos articulares siendo esto característico del perfil M2. Este resultado es opuesto al aumento en la expresión de IRF5 asociado al perfil M1. Si bien, los resultados del FACS son claves en este trabajo, poder contar con técnicas que permitan el análisis de un mayor número de marcadores, como la citometría espectral, sería la mejor opción para determinar mediante el uso de numerosos anticuerpos el perfil citológico de los macrófagos articulares.

En cuanto al modelo clínico, se observó una mayor frecuencia del sexo femenino, lo cual se puede atribuir al hecho de que, como se mencionó previamente, los factores hormonales desempeñan un papel relevante en la patogenia de la AR. Por otro lado, es importante señalar que la media de edad fue superior en los pacientes en comparación con los controles. Este aspecto podría constituir una limitación del estudio, generando un sesgo de selección, dado que los controles incluidos tienen una edad menor, lo que podría implicar que se encuentren en una etapa preclínica de la enfermedad.

Otro dato demográfico que presentó diferencias significativas fue la prevalencia de hipertensión arterial (HTA). Este hallazgo puede explicarse por diversas razones: el tratamiento crónico con corticoides (cuyo efecto adverso conocido es la HTA), así como la propia AR se considera un factor de riesgo cardiovascular independiente dada la inflamación sistémica crónica [\(114\)](#).

En concordancia con los datos epidemiológicos de la AR [\(115\)](#), en nuestro trabajo también denotamos un marcado componente familiar en pacientes respecto a los controles remarcando el componente genético de esta enfermedad.

La fibromialgia y la AR comparten síntomas como dolor y fatiga, pero difieren en sus mecanismos patogénicos. Un estudio de Durmaz y Ilhanli [\(116\)](#) encontró que los pacientes con AR tienen una mayor prevalencia de fibromialgia y además mayor actividad de la enfermedad, lo que sugiere que la FM agrava el dolor percibido en la AR. En nuestro estudio, la prevalencia de fibromialgia fue marcadamente superior en el grupo de pacientes con AR en comparación con los controles.

Además, es importante destacar que el grupo de pacientes tenía una mediana de seguimiento de 13 años, siendo los pacientes recientemente diagnosticados pobremente representados en este estudio. En el estudio mencionado previamente de Mateen y colaboradores, al subclasificar a los pacientes según la duración de la enfermedad, se encontró una diferencia significativa entre los distintos parámetros evaluados, lo que sugiere que el estrés oxidativo aumenta con la progresión de la AR [\(112\)](#).

En el marco de este trabajo, se identificaron dos pacientes con alta actividad de la enfermedad que no estaban recibiendo tratamiento farmacológico al momento de su evaluación inicial. Ambas presentaban secuelas articulares significativas, lo que evidencia el impacto acumulativo de la inflamación persistente no controlada, siendo una enfermedad limitante.

Como se ha descrito en la población de pacientes con AR, el solapamiento más frecuente en nuestro grupo fue con LES, seguido por SS [\(115\)](#).

En cuanto a los tratamientos, el grupo de pacientes presentó una gran heterogeneidad, lo que impidió realizar un análisis por subgrupos basado en esta variable. Es importante destacar que el metotrexato fue el FAME más utilizado, siendo el fármaco de primera línea recomendado [\(26\)](#). Sorprendentemente, un número elevado de pacientes recibía leflunomida, en la mayoría de los casos en combinación con un biológico o un sintético. Entre los fármacos biológicos, el más frecuentemente empleado fue el Adalimumab, esto se explica dado que es uno de los primeros fármacos biológicos en incorporarse a las prestaciones del FNR (año 2010), y probablemente a la facilidad de administración (vía subcutánea). [\(2\)](#). Por último, cabe resaltar que el Rituximab ha perdido protagonismo en el tratamiento de la AR, lo que se asocia a un menor papel de los linfocitos B en el mantenimiento y progresión de la enfermedad. En nuestra población, todos los pacientes que recibían rituximab presentaban solapamiento con LES.

Un 28% de los pacientes se encontraban recibiendo tratamiento con prednisona, de los cuales la mitad a dosis altas, siendo la totalidad de estos pacientes categorizados en el grupo de alta actividad. Para los restantes pacientes, en su mayoría se encontraban en un descenso paulatino de los mismos, estando actualmente con menos de 5 mg diarios. Esto subraya las dificultades persistentes en el tratamiento de la AR, a pesar de la disponibilidad de los FAMES que contamos en la actualidad.

Destacamos que, para ambos scores de actividad, el grupo de baja actividad estuvo pobremente representado. Al haber finalizado la etapa de recolección de muestras, es un aspecto que no pudo ser equitativamente representado entre los grupos. La alta prevalencia de pacientes en moderada y alta actividad consideramos se debe a que los pacientes reclutados son aquellos que más frecuentemente consultaron en la policlínica, asociado a un seguimiento más estrecho de los mismos. Como fue mencionado anteriormente, el análisis por actividad de la enfermedad representa un análisis de subgrupo no planificado previamente, siendo su análisis principal realizado con el objetivo de generar hipótesis. De realizar ensayos posteriores, dada la importancia de la variable actividad de la enfermedad, sería importante balancear los grupos idealmente también con el tratamiento.

En cuanto a los resultados de los scores de actividad, es importante destacar la utilidad del CDAI como un buen predictor de la actividad de la enfermedad a pesar de no contar con un parámetro paraclínico, permitiendo tomar decisiones individualizadas en la consulta médica.

Abordando nuevamente el perfil biológico monocitario, mostramos que la producción de ROS por monocitos clásicos y no clásicos en pacientes con AR se correlaciona negativamente con los síntomas clínicos y la actividad de la enfermedad.

En humanos, los monocitos se dividen en tres subgrupos según la expresión en superficie del receptor de membrana de lipopolisacáridos CD14 y del receptor Fcγ de baja afinidad CD16, que difieren en su capacidad fagocítica, producción de citocinas y propiedades migratorias ([117](#), [118](#)). Los monocitos clásicos, el subgrupo mayoritario, son CD14⁺CD16⁻. Estos monocitos pueden diferenciarse en osteoclastos bajo condiciones adecuadas ([119](#)). Los monocitos CD16⁺ pueden dividirse en monocitos intermedios (CD14⁺CD16⁺) y monocitos no clásicos (CD14^{lo} CD16⁺). Estudios previos han reportado que los monocitos de la sangre periférica de pacientes con AR se correlacionan positivamente con la actividad de la enfermedad y los niveles de proteína C reactiva (PCR) ([120](#), [121](#)). Nuestros resultados coinciden con estas observaciones, ya que encontramos un aumento en los tres subgrupos de monocitos en pacientes con AR. Además, los niveles de monocitos CD14⁺CD16⁻ y CD14^{lo}CD16⁺ se correlacionaron con la actividad de la enfermedad, lo que sugiere su implicación en la patogénesis de la AR. Es relevante destacar que los niveles de estos subgrupos de monocitos en pacientes en remisión fueron similares a los de los controles sanos. Sin embargo, aunque los monocitos CD14⁺CD16⁺ estaban aumentados en los pacientes con AR, no se correlacionaron con la actividad de la enfermedad. Trabajos previos han detectado un aumento de monocitos CD14⁺CD16⁺ en sangre periférica y tejidos inflamados de pacientes con AR ([122-126](#)). Dado que los monocitos CD14⁺CD16⁻ pueden convertirse en monocitos CD14⁺CD16⁺ antes de diferenciarse finalmente en monocitos CD14^{lo}CD16⁺ ([127](#)), podríamos especular que, en los pacientes estudiados, los monocitos intermedios se diferencian en monocitos no clásicos. De manera interesante, la IL-6 en plasma de pacientes con AR aumentó con la actividad de la enfermedad. Entonces, tanto los subgrupos de monocitos como la IL-6 están relacionados con los síntomas de la AR y podrían considerarse indicadores de la respuesta inmune inflamatoria en estos pacientes.

Los niveles de ROS, superóxido y óxido nítrico están elevados en el infiltrado sinovial de pacientes con artritis reumatoide ([128](#), [129](#)). Por lo tanto, se ha propuesto que la cuantificación de ROS en sangre periférica podría servir como una medida indirecta del estado oxidante en los sitios de daño tisular ([130](#), [131](#)). Sin embargo, el papel de las ROS en la AR ha sido objeto de debate. Mientras que algunos estudios destacan

su función proinflamatoria y patológica, otros evidencian un rol protector que atenúa los signos clínicos y el daño al cartílago [\(132\)](#). Por ejemplo, se cree que una mayor proporción de macrófagos M1 contribuye a la producción de ROS en la articulación, junto con citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF α e IL-6. Esto activa a los condrocitos y fibroblastos sinoviales, lo que finalmente conduce a daño cartilaginoso e hiperplasia sinovial [\(133-135\)](#).

Profundizando sobre el segundo modelo murino, demostramos que la deficiencia de NOX2 incrementa los signos clínicos de AR en ratones y la inflamación, lo que sugiere que las ROS producidas por fagocitos también pueden desempeñar funciones antiinflamatorias en la artritis y atenuar la gravedad de la enfermedad. De hecho, nuestro trabajo indica que niveles bajos de ROS, debido a la deficiencia de NOX2, incrementan los signos clínicos de AR en ratones. En ausencia de actividad de NOX2, se observa un mayor nivel de macrófagos M1 y niveles sistémicos elevados de IFN γ , TNF α , IL-1 β e IL-6 en comparación con sus compañeros de camada, lo que indica una respuesta inmune Th1 aumentada. Esto es consistente con estudios previos que muestran que los ratones deficientes en NOX2 desarrollan una inflamación articular severa con daño irreversible en el cartílago [\(132, 136, 137\)](#).

Respecto a los resultados de la qRT-PCR consideramos que no tienen mucho valor aplicable por el poco valor representativo de la muestra dado por un tamaño pequeño, la necesidad de polear muestras y la regular calidad del contenido de cDNA.

Las ROS también pueden regular la inflamación sistémica [\(138-140\)](#). Los mecanismos que explican el papel protector de las ROS derivadas de NOX2 se basan en su capacidad para regular la activación de células T, ya que disminuyen la presentación de antígenos por parte de los macrófagos y la activación de células T autorreactivas [\(137, 141-149\)](#) en la fase inicial de la enfermedad [\(143, 145\)](#). Además, existe evidencia que indica que los macrófagos M1 están más activados en ausencia de ROS [\(146, 147\)](#).

Las ROS reducen los niveles de IL-1 β activa al inhibir el clivaje de la pro-IL-1 β [\(140\)](#) y modulan el reclutamiento y función de los granulocitos en el tejido inflamatorio, modificando la actividad de las moléculas de adhesión leucocitaria [\(150\)](#) o las vías de señalización que inducen mediadores proinflamatorios [\(151\)](#).

A pesar de estas evidencias, los estudios sobre la correlación de la producción de ROS por monocitos o macrófagos con la actividad de la AR son limitados. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, que indican que las ROS producidas por diferentes subgrupos de monocitos circulantes en pacientes con AR se correlacionan negativamente con la gravedad de la enfermedad, sugieren que la medición de ROS

podría ser un marcador predictivo del grado de inflamación en pacientes con AR. Otros estudios que determinaron ROS en suero concuerdan con esta observación ([131](#), [152](#), [153](#)). Estos resultados se complementaron con niveles elevados de la enzima antioxidante HO-1, que aumentó con la actividad de la enfermedad en los subgrupos de monocitos CD14⁺CD16⁻ y CD14^{lo}CD16⁺. HO-1 es un gen regulado por Nrf2, crucial en la respuesta antioxidante y antiinflamatoria para proporcionar citoprotección ([154](#)).

Por último, sería relevante estudiar si los niveles de ROS en los subgrupos de monocitos están relacionados con los tratamientos de los pacientes con artritis reumatoide. Todos los pacientes de nuestra cohorte estaban bajo tratamiento con FAME. Sin embargo, solo algunos recibían inmunoterapia con anticuerpos monoclonales o sintéticos dirigidos exclusivamente. Por tanto, el bajo número de pacientes en cada subgrupo, junto con la variabilidad de los tratamientos, dificulta la obtención de conclusiones definitivas, resaltando la importancia de evaluar a los pacientes según el puntaje de actividad de la enfermedad.

Una observación destacada fue la disminución del número de plaquetas en la sangre periférica tanto en ratones como en pacientes con AR, más evidente en los ratones deficientes en NOX2 con artritis. En los últimos años, se ha establecido el papel de las plaquetas en la inflamación y la inmunomodulación en enfermedades autoinmunes, como la AR ([155](#)). Las plaquetas pueden unirse a los monocitos, induciendo cambios en su función y en la liberación de citoquinas proinflamatorias ([156](#)). De hecho, la interacción plaqueta-monocito induce una transición de los monocitos clásicos CD14⁺CD16⁻ hacia monocitos intermedios CD14⁺CD16⁺ y favorece la diferenciación de los monocitos en macrófagos ([158](#)). Sin embargo, las plaquetas también pueden atenuar las respuestas inmunes inflamatorias al aumentar la producción de IL-10 y reducir la liberación de IL-6 y TNF α por los monocitos ([158](#), [159](#)). En la AR, el recuento de plaquetas suele aumentar con la progresión de la enfermedad ([159](#)). El hecho de que hayamos observado el efecto contrario en pacientes y ratones con AR podría reflejar una trombopoyesis inflamatoria inespecífica o un consumo excesivo en los sitios inflamatorios ([154](#), [156](#)). Otra posibilidad que debe explorarse es que las plaquetas estén interactuando con los monocitos. Por último, no se puede descartar que los FAME modifiquen el recuento o la actividad de las plaquetas, como se ha reportado previamente ([159](#)).

Conclusión general

En resumen, en este trabajo utilizamos un modelo de CIA que nos permitió evaluar diferentes parámetros inflamatorios, vincularlos con la población monocítica sanguínea y macrofágica articular con un eje transversal en la producción de especies reactivas del oxígeno. Profundizamos en estas moléculas complejas, demostrando un rol no canónico asociado a una mayor severidad de la enfermedad en un modelo murino deficiente de ROS. Desde el punto de vista clínico, analizamos los mismos pilares inflamatorios, los vinculamos con la actividad de la enfermedad y detectamos que el estrés oxidativo de la población monocítica circulante de pacientes con AR se correlaciona negativamente con la actividad de la enfermedad.

Bibliografía APA 7^{ma}

- (1) Firestein, G. S. (2017). *Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis*. In Kelley and Firestein's *Textbook of Rheumatology* (pp. 1115-1166.e7). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-31696-5.00069-3>
- (2) Fondo Nacional de Recursos. (2022). *Normativa para el tratamiento de la artritis reumatoidea con Adalimumab, Etanercept, Golimumab, Infliximab, Rituximab, Tocilizumab, Tofacitinib y Upadacitinib*. Fondo Nacional de Recursos. Recuperado de [FNR](#)
- (3) Díaz Cuña, C., Consani, S., Rostan, S., Fernández, L., Moreira, E., & Sanmartí, R. (2022). Rheumatoid arthritis: Extra-articular manifestations and comorbidities. *Revista Colombiana de Reumatología (English Edition)*, 29(3), 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.rcreue.2021.03.003>
- (4) Katz, P. P., Morris, A., & Yelin, E. H. (2006). Prevalence and predictors of disability in valued life activities among individuals with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 65(6), 763–769. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.044677>
- (5) Eberhardt, K., Larsson, B. M., Nived, K., & Lindqvist, E. (2007). Work disability in rheumatoid arthritis--development over 15 years and evaluation of predictive factors over time. *The Journal of rheumatology*, 34(3), 481–487.
- (6) Balfour G. W. (1876). *On Rheumatoid Arthritis: Its Diagnosis, Pathology, and Treatment*. *Edinburgh medical journal*, 21(10), 920–929.
- (7) Matcham, F., Scott, I. C., Rayner, L., Hotopf, M., Kingsley, G. H., Norton, S., Scott, D. L., & Steer, S. (2014). The impact of rheumatoid arthritis on quality-of-life assessed using the SF-36: a systematic review and meta-analysis. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 44(2), 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2014.05.001>
- (8) Wolfe, F., & Zwillich, S. H. (1998). The long-term outcomes of rheumatoid arthritis: a 23-year prospective, longitudinal study of total joint replacement and its predictors in 1,600 patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 41(6), 1072–1082. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199806\)41:6<1072::AID-ART14>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199806)41:6<1072::AID-ART14>3.0.CO;2-G)
- (9) Bongartz, T., Nannini, C., Medina-Velasquez, Y. F., Achenbach, S. J., Crowson, C. S., Ryu, J. H., Vassallo, R., Gabriel, S. E., & Matteson, E. L. (2010). Incidence and mortality of interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis and rheumatism*, 62(6), 1583–1591. <https://doi.org/10.1002/art.27405>

- (10) Xue, A. L., Wu, S. Y., Jiang, L., Feng, A. M., Guo, H. F., & Zhao, P. (2017). Bone fracture risk in patients with rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Medicine*, 96(36), e6983. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000006983>
- (11) Simon, T. A., Thompson, A., Gandhi, K. K., Hochberg, M. C., & Suissa, S. (2015). Incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Arthritis research & therapy*, 17(1), 212. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0728-9>
- (12) England, B. R., Sayles, H., Michaud, K., Caplan, L., Davis, L. A., Cannon, G. W., Sauer, B. C., Solow, E. B., Reimold, A. M., Kerr, G. S., Schwab, P., Baker, J. F., & Mikuls, T. R. (2016). Cause-Specific Mortality in Male US Veterans With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis care & research*, 68(1), 36–45. <https://doi.org/10.1002/acr.22642>
- (13) Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). (n.d.). Rheumatoid arthritis; RA (MIM #180300). <https://www.omim.org/entry/180300>. Consultado el 11 de noviembre de 2024.
- (14) Díaz, C., Yandian, M., & Bianchi, S. (2017). Mecanismos de los procesos patológicos y bases para su diagnóstico y tratamiento. En *Departamento Básico de Medicina* (Ed.), *Inmunopatología* (Cap. 4, pp. 53-77). Oficina del Libro de la Facultad de Medicina.
- (15) Guthrie, K. A., Dugowson, C. E., Voigt, L. F., Koepsell, T. D., & Nelson, J. L. (2010). Does pregnancy provide vaccine-like protection against rheumatoid arthritis?. *Arthritis and rheumatism*, 62(7), 1842–1848. <https://doi.org/10.1002/art.27459>
- (16) Dugowson, C. E., Koepsell, T. D., Voigt, L. F., & Nelson, J. L. (1991). Rheumatoid arthritis in women: Incidence rates in Group Health Cooperative, Seattle, Washington, 1987-1989. *Arthritis & Rheumatism*, 34(12), 1502.
- (17) Joo, Y. B., Lim, Y. H., Kim, K. J., Park, K. S., & Park, Y. J. (2019). Respiratory viral infections and the risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, 21(1), 199. <https://doi.org/10.1186/s13075-019-1977-9>
- (18) Díaz, C., Yandian, M., & Bianchi, S. (2017). Mecanismos de los procesos patológicos y bases para su diagnóstico y tratamiento. En *Departamento Básico de Medicina* (Ed.), *Inmunopatología* (Cap. 4, pp. 63). Oficina del Libro de la Facultad de Medicina.

- (19) Zhao, T., Wei, Y., Zhu, Y., Xie, Z., Hai, Q., Li, Z., & Qin, D. (2022). Gut microbiota and rheumatoid arthritis: From pathogenesis to novel therapeutic opportunities. *Frontiers in immunology*, 13, 1007165. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1007165>
- (20) Nishimura, K., Sugiyama, D., Kogata, Y., Tsuji, G., Nakazawa, T., Kawano, S., Saigo, K., Morinobu, A., Koshiba, M., Kuntz, K. M., Kamae, I., & Kumagai, S. (2007). Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Annals of internal medicine*, 146(11), 797–808. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-146-11-200706050-00008>
- (21) Quinn, M. A., Green, M. J., Marzo-Ortega, H., Proudman, S., Karim, Z., Wakefield, R. J., Conaghan, P. G., & Emery, P. (2003). Prognostic factors in a large cohort of patients with early undifferentiated inflammatory arthritis after application of a structured management protocol. *Arthritis and rheumatism*, 48(11), 3039–3045. <https://doi.org/10.1002/art.11269>
- (22) Avouac, J., Gossec, L., & Dougados, M. (2006). Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Annals of the rheumatic diseases*, 65(7), 845–851. <https://doi.org/10.1136/ard.2006.051391>
- (23) Halldórsdóttir, H. D., Jónsson, T., Thorsteinsson, J., & Valdimarsson, H. (2000). A prospective study on the incidence of rheumatoid arthritis among people with persistent increase of rheumatoid factor. *Annals of the rheumatic diseases*, 59(2), 149–151. <https://doi.org/10.1136/ard.59.2.149>
- (24) Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A. J., Funovits, J., Felson, D. T., Bingham, C. O., 3rd, Birnbaum, N. S., Burmester, G. R., Bykerk, V. P., Cohen, M. D., Combe, B., Costenbader, K. H., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J. M., Hobbs, K., Huizinga, T. W., Kavanaugh, A., Kay, J., ... Hawker, G. (2010). 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Annals of the rheumatic diseases*, 69(9), 1580–1588. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.138461>
- (25) Saag, K. G., Teng, G. G., Patkar, N. M., Anuntiyo, J., Finney, C., Curtis, J. R., Paulus, H. E., Mudano, A., Pisu, M., Elkins-Melton, M., Outman, R., Allison, J. J., Suarez-Almazor, M., Bridges, S. L. Jr., Chatham, W. W., Hochberg, M., MacLean, C., Mikuls, T., Moreland, L. W., ... American College of Rheumatology. (2008). American College of Rheumatology 2008 recommendations for the use of nonbiologic and biologic disease-modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 59(6), 762–784. <https://doi.org/10.1002/art.23721>

- (26) EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2022 update. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 82(1), 3–18. <https://doi.org/10.1136/ard-2022-223356>
- (27) Brodin, N., Eurenus, E., Jensen, I., Nisell, R., Opava, C. H., & PARA Study Group. (2008). Coaching patients with early rheumatoid arthritis to healthy physical activity: A multicenter, randomized, controlled study. *Arthritis & Rheumatism*, 59(3), 325–331. <https://doi.org/10.1002/art.23327>
- (28) Baillet, A., Payraud, E., Niderprim, V. A., Nissen, M. J., Allenet, B., François, P., Grange, L., Casez, P., Juvin, R., & Gaudin, P. (2009). A dynamic exercise programme to improve patients' disability in rheumatoid arthritis: A prospective randomized controlled trial. *Rheumatology (Oxford)*, 48(4), 410–415. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken511>
- (29) Han, A., Robinson, V., Judd, M., Taixiang, W., Wells, G., & Tugwell, P. (2004). Tai chi for treating rheumatoid arthritis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2004(3), CD004849. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004849>
- (30) Eisenberg Center at Oregon Health & Science University. (2008). Choosing Medications for Rheumatoid Arthritis: Clinician's Guide . In Comparative Effectiveness Review Summary Guides for Clinicians. Agency for Healthcare Research and Quality (US).
- (31) Deighton, C., O'Mahony, R., Tosh, J., Turner, C., Rudolf, M., & Guideline Development Group (2009). Management of rheumatoid arthritis: summary of NICE guidance. *BMJ (Clinical research ed.)*, 338, b702. <https://doi.org/10.1136/bmj.b702>
- (32) van der Heijde, D. M., van't Hof, M. A., van Riel, P. L., van Leeuwen, M. A., van Rijswijk, M. H., & van de Putte, L. B. (1992). Validity of single variables and composite indices for measuring disease activity in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 51(2), 177–181. <https://doi.org/10.1136/ard.51.2.177>
- (33) Dawes, P. T., Fowler, P. D., Clarke, S., Fisher, J., Lawton, A., & Shadforth, M. F. (1986). Rheumatoid arthritis: treatment which controls the C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate reduces radiological progression. *British journal of rheumatology*, 25(1), 44–49. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/25.1.44>
- (34) Mallya, R. K., de Beer, F. C., Berry, H., Hamilton, E. D., Mace, B. E., & Pepys, M. B. (1982). Correlation of clinical parameters of disease activity in rheumatoid arthritis with

serum concentration of C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate. *The Journal of rheumatology*, 9(2), 224–228.

(35) Siegel, J. N., & Zhen, B. G. (2005). Use of the American College of Rheumatology N (ACR-N) index of improvement in rheumatoid arthritis: argument in favor. *Arthritis and rheumatism*, 52(6), 1637–1641. <https://doi.org/10.1002/art.21243>

(36) van der Heijde, D. M., van 't Hof, M., van Riel, P. L., & van de Putte, L. B. (1993). Development of a disease activity score based on judgment in clinical practice by rheumatologists. *The Journal of rheumatology*, 20(3), 579–581.

(37) González, A., Maldonado, N., & Pérez, A. (2019). Microbiota y sistema inmune: una relación bidireccional en salud y enfermedad. *Revista Médica de la Universidad Nacional de Córdoba*, 77(1), 63-74. <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/med/article/view/22218/23320>. Acceso el 1 de febrero de 2025.

(38) van der Heijde, D., Klareskog, L., Boers, M., Landewé, R., Codreanu, C., Bolosiu, H. D., Pedersen, R., Fatenejad, S., & TEMPO Investigators (2005). Comparison of different definitions to classify remission and sustained remission: 1 year TEMPO results. *Annals of the rheumatic diseases*, 64(11), 1582–1587. <https://doi.org/10.1136/ard.2004.034371>

(39) Biomarkers Definitions Working Group.. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69:89

(40) Rioja, I., Hughes, F. J., Sharp, C. H., Warnock, L. C., Montgomery, D. S., Akil, M., Wilson, A. G., Binks, M. H., & Dickson, M. C. (2008). Potential novel biomarkers of disease activity in rheumatoid arthritis patients: CXCL13, CCL23, transforming growth factor alpha, tumor necrosis factor receptor superfamily member 9, and macrophage colony-stimulating factor. *Arthritis and rheumatism*, 58(8), 2257–2267. <https://doi.org/10.1002/art.23667>

(41) Makrygiannakis, D., Hermansson, M., Ulfgren, A. K., Nicholas, A. P., Zendman, A. J., Eklund, A., Grunewald, J., Skold, C. M., Klareskog, L., & Catrina, A. I. (2008). Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Annals of the rheumatic diseases*, 67(10), 1488–1492. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.075192>

(42) Firestein, G. S., & McInnes, I. B. (2017). Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity*, 46(2), 183–196. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.006>

- (43) Lee, D. M., & Weinblatt, M. E. (2001). Rheumatoid arthritis. *Lancet* (London, England), 358(9285), 903–911. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06075-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06075-5)
- (44) Chang, M. H., & Nigrovic, P. A. (2019). Antibody-dependent and -independent mechanisms of inflammatory arthritis. *JCI Insight*, 4. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.129651>
- (45) de Hair, M. J., van de Sande, M. G., Ramwadhoebe, T. H., Hansson, M., Landewé, R., van der Leij, C., Maas, M., Serre, G., van Schaardenburg, D., Klareskog, L., Gerlag, D. M., van Baarsen, L. G., & Tak, P. P. (2014). Features of the synovium of individuals at risk of developing rheumatoid arthritis: implications for understanding preclinical rheumatoid arthritis. *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, N.J.), 66(3), 513–522. <https://doi.org/10.1002/art.38273>
- (46) Zhang, F., Jonsson, A. H., Nathan, A., Millard, N., Curtis, M., Xiao, Q., Gutierrez-Arcelus, M., Apruzzese, W., Watts, G. F. M., Weisenfeld, D., Nayar, S., Rangel-Moreno, J., Meednu, N., Marks, K. E., Mantel, I., Kang, J. B., Rumker, L., Mears, J., Slowikowski, K., Weinand, K., ... Raychaudhuri, S. (2023). Deconstruction of rheumatoid arthritis synovium defines inflammatory subtypes. *Nature*, 623(7987), 616–624. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06708-y>
- (47) Lefèvre, S., Knedla, A., Tennie, C., Kampmann, A., Wunrau, C., Dinser, R., Korb, A., Schnäker, E. M., Tarner, I. H., Robbins, P. D., Evans, C. H., Stürz, H., Steinmeyer, J., Gay, S., Schölmerich, J., Pap, T., Müller-Ladner, U., & Neumann, E. (2009). Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nature medicine*, 15(12), 1414–1420. <https://doi.org/10.1038/nm.2050>
- (48) Zhang, F., Wei, K., Slowikowski, K., Fonseka, C. Y., Rao, D. A., Kelly, S., Goodman, S. M., Tabechian, D., Hughes, L. B., Salomon-Escoto, K., Watts, G. F. M., Jonsson, A. H., Rangel-Moreno, J., Meednu, N., Rozo, C., Apruzzese, W., Eisenhaure, T. M., Lieb, D. J., Boyle, D. L., Mandelin, A. M., 2nd, ... Raychaudhuri, S. (2019). Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nature immunology*, 20(7), 928–942. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0378-1>
- (49) Snir, O., Widhe, M., Hermansson, M., von Spee, C., Lindberg, J., Hensen, S., Lundberg, K., Engström, A., Venables, P. J., Toes, R. E., Holmdahl, R., Klareskog, L., & Malmström, V. (2010). Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis and rheumatism*, 62(1), 44–52. <https://doi.org/10.1002/art.25036>

- (50) Takizawa, Y., Suzuki, A., Sawada, T., Ohsaka, M., Inoue, T., Yamada, R., & Yamamoto, K. (2006). Citrullinated fibrinogen detected as a soluble citrullinated autoantigen in rheumatoid arthritis synovial fluids. *Annals of the rheumatic diseases*, 65(8), 1013–1020. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.044743>
- (51) Marston, B., Palanichamy, A., & Anolik, J. H. (2010). B cells in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Current opinion in rheumatology*, 22(3), 307–315. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e3283369cb8>
- (52) Kavanaugh, A., Rosengren, S., Lee, S. J., Hammaker, D., Firestein, G. S., Kalunian, K., Wei, N., & Boyle, D. L. (2008). Assessment of rituximab's immunomodulatory synovial effects (ARISE trial). 1: clinical and synovial biomarker results. *Annals of the rheumatic diseases*, 67(3), 402–408. <https://doi.org/10.1136/ard.2007.074229>
- (53) Stefater, J. A., 3rd, Ren, S., Lang, R. A., & Duffield, J. S. (2011). Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration. *Trends in molecular medicine*, 17(12), 743–752. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.07.009>
- (54) Hume D. A. (2006). The mononuclear phagocyte system. *Current opinion in immunology*, 18(1), 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.11.008>
- (55) Hume, D. A., Irvine, K. M., & Pridans, C. (2019). The Mononuclear Phagocyte System: The Relationship between Monocytes and Macrophages. *Trends in immunology*, 40(2), 98–112. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.11.007>
- (56) Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496(7446), 445–455. <https://doi.org/10.1038/nature12034>
- (57) Ginhoux, F., & Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*, 44(3), 439–449. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024>
- (58) Brady, R. V., & Thamm, D. H. (2023). Tumor-associated macrophages: Prognostic and therapeutic targets for cancer in humans and dogs. *Frontiers in Immunology*, 14, 1176807. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1176807>
- (59) Guilliams, M., Thierry, G. R., Bonnardel, J., & Bajenoff, M. (2020). Establishment and Maintenance of the Macrophage Niche. *Immunity*, 52(3), 434–451. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.02.015>

- (60) Rana, A. K., Li, Y., Dang, Q., & Yang, F. (2018). Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis. *International immunopharmacology*, 65, 348–359. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.10.016>
- (61) Kapellos, T. S., Bonaguro, L., Gemünd, I., Reusch, N., Saglam, A., Hinkley, E. R., & Schultze, J. L. (2019). Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Frontiers in immunology*, 10, 2035. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02035>
- (62) Cutolo, M., Campitiello, R., Gotelli, E., & Soldano, S. (2022). The Role of M1/M2 Macrophage Polarization in Rheumatoid Arthritis Synovitis. *Frontiers in immunology*, 13, 867260. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.867260>
- (63) Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C., & Wagner, U. (2012). The CD14(bright) CD16+ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis and rheumatism*, 64(3), 671–677. <https://doi.org/10.1002/art.33418>
- (64) Kawanaka, N., Yamamura, M., Aita, T., Morita, Y., Okamoto, A., Kawashima, M., Iwahashi, M., Ueno, A., Ohmoto, Y., & Makino, H. (2002). CD14+,CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 46(10), 2578–2586. <https://doi.org/10.1002/art.10545>
- (65) Komano, Y., Nanki, T., Hayashida, K., Taniguchi, K., & Miyasaka, N. (2006). Identification of a human peripheral blood monocyte subset that differentiates into osteoclasts. *Arthritis research & therapy*, 8(5), R152. <https://doi.org/10.1186/ar2046>
- (66) Yoon, B. R., Yoo, S. J., Choi, Y.h, Chung, Y. H., Kim, J., Yoo, I. S., Kang, S. W., & Lee, W. W. (2014). Functional phenotype of synovial monocytes modulating inflammatory T-cell responses in rheumatoid arthritis (RA). *PloS one*, 9(10), e109775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109775>
- (67) Weldon AJ, Moldovan I, Cabling MG, Hernandez EA, Hsu S, Gonzalez J, et al. Surface APRIL Is Elevated on Myeloid Cells and Is Associated With Disease Activity in Patients With Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol* (2015) 42(5):749–59. doi: 10.3899/jrheum.140630
- (68) Lacerte, P., Brunet, A., Egarnes, B., Duchêne, B., Brown, J. P., & Gosselin, J. (2016). Overexpression of TLR2 and TLR9 on monocyte subsets of active rheumatoid arthritis patients contributes to enhance responsiveness to TLR agonists. *Arthritis research & therapy*, 18, 10. <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0901-1>

- (69) Rodríguez-Ubreva, J., de la Calle-Fabregat, C., Li, T., Ciudad, L., Ballestar, M. L., Català-Moll, F., Morante-Palacios, O., Garcia-Gomez, A., Celis, R., Humby, F., Nerviani, A., Martin, J., Pitzalis, C., Cañete, J. D., & Ballestar, E. (2019). Inflammatory cytokines shape a changing DNA methylome in monocytes mirroring disease activity in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 78(11), 1505–1516. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215355>
- (70) Thomas, G., Tacke, R., Hedrick, C. C., & Hanna, R. N. (2015). Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 35(6), 1306–1316. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304650>
- (71) Yao, Y., Xu, X. H., & Jin, L. (2019). Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Frontiers in immunology*, 10, 792. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00792>.
- (72) Arango Duque, G., & Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in immunology*, 5, 491. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00491>
- (73) Tang, J., Cheng, X., Yi, S., Zhang, Y., Tang, Z., Zhong, Y., Zhang, Q., Pan, B., & Luo, Y. (2021). Euphorbia Factor L2 ameliorates the Progression of K/BxN Serum-Induced Arthritis by Blocking TLR7 Mediated IRAK4/IKK β /IRF5 and NF- κ B Signaling Pathways. *Frontiers in pharmacology*, 12, 773592. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.773592>
- (74) Schett, G., Tohidast-Akrad, M., Smolen, J. S., Schmid, B. J., Steiner, C. W., Bitzan, P., Zenz, P., Redlich, K., Xu, Q., & Steiner, G. (2000). Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 43(11), 2501–2512. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200011\)43:11<2501::AID-ANR18>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200011)43:11<2501::AID-ANR18>3.0.CO;2-K)
- (75) Ibáñez, L., Abou-Ezzi, G., Ciucci, T., Amiot, V., Belaïd, N., Obino, D., Mansour, A., Rouleau, M., Wakkach, A., & Blin-Wakkach, C. (2016). Inflammatory Osteoclasts Prime TNF α -Producing CD4 $^{+}$ T Cells and Express CX3 CR1. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 31(10), 1899–1908. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2868>
- (76) Hasegawa T, Kikuta J, Sudo T, Matsuura Y, Matsui T, Simmons S, et al.

Identification of a Novel Arthritis-Associated Osteoclast Precursor Macrophage Regulated by Foxm1. *Nat Immunol* (2019) 20:1631–42. doi: 10.1038/s41590-019-0526-7

(77) Salisbury, A. K., Duke, O., & Poulter, L. W. (1987). Macrophage-like cells of the pannus area in rheumatoid arthritic joints. *Scandinavian journal of rheumatology*, 16(4), 263–272. <https://doi.org/10.3109/03009748709102927>

(78) Abdelaziz, M. H., Abdelwahab, S. F., Wan, J., Cai, W., Huixuan, W., Jianjun, C., Kumar, K. D., Vasudevan, A., Sadek, A., Su, Z., Wang, S., & Xu, H. (2020). Alternatively activated macrophages; a double-edged sword in allergic asthma. *Journal of translational medicine*, 18(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02251-w>

(79) Law, S. K., Micklem, K. J., Shaw, J. M., Zhang, X. P., Dong, Y., Willis, A. C., & Mason, D. Y. (1993). A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. *European journal of immunology*, 23(9), 2320–2325. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230940>

(80) Kristiansen, M., Graversen, J. H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H. J., Law, S. K., & Moestrup, S. K. (2001). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, 409(6817), 198–201. <https://doi.org/10.1038/35051594>

(81) Alvaro-Gracia, J. M., Zvaifler, N. J., Brown, C. B., Kaushansky, K., & Firestein, G. S. (1991). Cytokines in chronic inflammatory arthritis. VI. Analysis of the synovial cells involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and gene expression in rheumatoid arthritis and its regulation by IL-1 and tumor necrosis factor-alpha. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 146(10), 3365–3371

(82) Behrens, F., Tak, P. P., Østergaard, M., Stoilov, R., Wiland, P., Huizinga, T. W., Berenfus, V. Y., Vladeva, S., Rech, J., Rubbert-Roth, A., Korkosz, M., Rekalov, D., Zupanets, I. A., Ejbjerg, B. J., Geiseler, J., Fresenius, J., Korolkiewicz, R. P., Schottelius, A. J., & Burkhardt, H. (2015). MOR103, a human monoclonal antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, in the treatment of patients with moderate rheumatoid arthritis: results of a phase Ib/IIa randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Annals of the rheumatic diseases*, 74(6), 1058–1064. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204816>

(83) Bonek, K., Roszkowski, L., Massalska, M., Maslinski, W., & Ciechomska, M. (2021). Biologic Drugs for Rheumatoid Arthritis in the Context of Biosimilars, Genetics, Epigenetics and COVID-19 Treatment. *Cells*, 10(2), 323. <https://doi.org/10.3390/cells10020323>

- (84) Gerritsen, M. E., Kelley, K. A., Ligon, G., Perry, C. A., Shen, C. P., Szczepanski, A., & Carley, W. W. (1993). Regulation of the expression of intercellular adhesion molecule 1 in cultured human endothelial cells derived from rheumatoid synovium. *Arthritis and rheumatism*, 36(5), 593–602. <https://doi.org/10.1002/art.1780360504>
- (85) Koch, A. E., Kunkel, S. L., Harlow, L. A., Johnson, B., Evanoff, H. L., Haines, G. K., Burdick, M. D., Pope, R. M., & Strieter, R. M. (1992). Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *The Journal of clinical investigation*, 90(3), 772–779. <https://doi.org/10.1172/JCI115950>
- (86) Cachat, J., Deffert, C., Hugues, S., & Krause, K. H. (2015). Phagocyte NADPH oxidase and specific immunity. *Clinical science (London, England : 1979)*, 128(10), 635–648. <https://doi.org/10.1042/CS20140635>
- (87) Radi R. (2018). Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(23), 5839–5848. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804932115>
- (88) Donlin, L. T., Jayatilleke, A., Giannopoulou, E. G., Kalliolias, G. D., & Ivashkiv, L. B. (2014). Modulation of TNF-induced macrophage polarization by synovial fibroblasts. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(5), 2373–2383. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400486>
- (89) Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N. J., Kelly, B., Foley, N. H., Zheng, L., Gardet, A., Tong, Z., Jany, S. S., Corr, S. C., Haneklaus, M., Caffrey, B. E., Pierce, K., Walmsley, S., Beasley, F. C., ... O'Neill, L. A. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*, 496(7444), 238–242. <https://doi.org/10.1038/nature11986>
- (90) Huang, Q. Q., Doyle, R., Chen, S. Y., Sheng, Q., Misharin, A. V., Mao, Q., Winter, D. R., & Pope, R. M. (2021). Critical role of synovial tissue-resident macrophage niche in joint homeostasis and suppression of chronic inflammation. *Science advances*, 7(2), eabd0515. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd0515>
- (91) Knowles H. J. (2015). Hypoxic regulation of osteoclast differentiation and bone resorption activity. *Hypoxia (Auckland, N.Z.)*, 3, 73–82. <https://doi.org/10.2147/HP.S95960>

- (92) Tudorachi, N. B., Totu, E. E., Fifere, A., et al. (2021). The implication of reactive oxygen species and antioxidants in knee osteoarthritis. *Antioxidants (Basel)*, 10(6), 985. <https://doi.org/10.3390/antiox10060985>
- (93) Sheng, K. C., Pietersz, G. A., Tang, C. K., Ramsland, P. A., & Apostolopoulos, V. (2010). Reactive oxygen species level defines two functionally distinctive stages of inflammatory dendritic cell development from mouse bone marrow. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 184(6), 2863–2872. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903458>
- (94) Momiuchi, Y., Motomura, Y., Suga, E., Mizuno, H., Kikuta, J., Morimoto, A., Mochizuki, M., Otaki, N., Ishii, M., & Moro, K. (2021). Group 2 innate lymphoid cells in bone marrow regulate osteoclastogenesis in a reciprocal manner via RANKL, GM-CSF and IL-13. *International immunology*, 33(11), 573–585. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxab062>
- (95) Ke, K., Sul, O. J., Choi, E. K., Safdar, A. M., Kim, E. S., & Choi, H. S. (2014). Reactive oxygen species induce the association of SHP-1 with c-Src and the oxidation of both to enhance osteoclast survival. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 307(1), E61–E70. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00044.2014>
- (96) Guo, X., & Chen, G. (2020). Hypoxia-Inducible Factor Is Critical for Pathogenesis and Regulation of Immune Cell Functions in Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in immunology*, 11, 1668. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01668>
- (97) Burrage, P. S., Mix, K. S., & Brinckerhoff, C. E. (2006). Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 11, 529–543. <https://doi.org/10.2741/1817>
- (98) Li, Y., Liang, Q., Zhou, L., Cao, Y., Yang, J., Li, J., Liu, J., Bi, J., & Liu, Y. (2022). An ROS-responsive artesunate prodrug nanosystem co-delivers dexamethasone for rheumatoid arthritis treatment through the HIF-1 α /NF- κ B cascade regulation of ROS scavenging and macrophage repolarization. *Acta biomaterialia*, 152, 406–424. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.08.054>
- (99) Drummond, G. S., Baum, J., Greenberg, M., Lewis, D., & Abraham, N. G. (2019). HO-1 overexpression and underexpression: Clinical implications. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 673, 108073. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108073>
- (100) Alam, J., Stewart, D., Touchard, C., Boinapally, S., Choi, A. M., & Cook, J. L. (1999). Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1

gene. The Journal of biological chemistry, 274(37), 26071–26078. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.37.26071>

(101) Alcaraz, M. J., & Ferrándiz, M. L. (2020). Relevance of Nrf2 and heme oxygenase-1 in articular diseases. Free radical biology & medicine, 157, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.007>

(102) He, C. H., Gong, P., Hu, B., Stewart, D., Choi, M. E., Choi, A. M., & Alam, J. (2001). Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. The Journal of biological chemistry, 276(24), 20858–20865. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101198200>

(103) Liu, Y., Zhu, B., Wang, X., Luo, L., Li, P., Paty, D. W., & Cynader, M. S. (2003). Bilirubin as a potent antioxidant suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the role of oxidative stress in the development of multiple sclerosis. Journal of neuroimmunology, 139(1-2), 27–35. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(03\)00132-2](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(03)00132-2)

(104) Sawada, K., Ohnishi, K., Kosaka, T., Chikano, S., Egashira, A., Okui, M., Shintani, S., Wada, M., Nakasho, K., & Shimoyama, T. (1997). Exacerbated autoimmune hepatitis successfully treated with leukocytapheresis and bilirubin adsorption therapy. Journal of gastroenterology, 32(5), 689–695. <https://doi.org/10.1007/BF02934123>

(105) Sun, B., Zou, X., Chen, Y., Zhang, P., & Shi, G. (2008). Preconditioning of carbon monoxide releasing molecule-derived CO attenuates LPS-induced activation of HUVEC. International journal of biological sciences, 4(5), 270–278. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4.270>

(106) Fujioka, K., Yang, W., Wallenstein, M. B., Zhao, H., Wong, R. J., Stevenson, D. K., & Shaw, G. M. (2015). Heme oxygenase-1 promoter polymorphisms and risk of spina bifida. Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology, 103(9), 741–746. <https://doi.org/10.1002/bdra.23343>

(107) Akitsu, A., & Iwakura, Y. (2016). Isolation of joint-infiltrating cells. Bio-protocol, 6(17). <https://www.bio-protocol.org/e1911>

(108) Caplazi, P., Baca, M., Barck, K., Carano, R. A., DeVoss, J., Lee, W. P., Bolon, B., & Diehl, L. (2015). Mouse Models of Rheumatoid Arthritis. Veterinary pathology, 52(5), 819–826. <https://doi.org/10.1177/0300985815588612>

(109) van Leeuwen, M. A., Westra, J., Limburg, P. C., van Riel, P. L., & van Rijswijk, M. H.

- (1995). Clinical significance of interleukin-6 measurement in early rheumatoid arthritis: relation with laboratory and clinical variables and radiological progression in a three year prospective study. *Annals of the rheumatic diseases*, 54(8), 674–677. <https://doi.org/10.1136/ard.54.8.674>
- (110) Chondrex, Inc. (2024). A protocol for successfully inducing collagen-induced arthritis (CIA) in mice. Chondrex, Inc. Recuperado de <https://www.chondrex.com>
- (111) Cooke, M. S., Mistry, N., Wood, C., Herbert, K. E., & Lunec, J. (1997). Immunogenicity of DNA damaged by reactive oxygen species--implications for anti-DNA antibodies in lupus. *Free radical biology & medicine*, 22(1-2), 151–159. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(96\)00283-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00283-3)
- (112) Mateen, S., Moin, S., Khan, A. Q., Zafar, A., & Fatima, N. (2016). Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. *PloS one*, 11(4), e0152925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152925>
- (113) Gao, J., Miao, J., Sun, H., Fu, X., Zhang, P., Chen, Z., & Zhu, P. (2022). TNF- α inhibitor ameliorates immune-related arthritis and pneumonitis in humanized mice. *Frontiers in immunology*, 13, 955812. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.955812>
- (114) Hill, J., Harrison, J., Christian, D., Reed, J., Clegg, A., Duffield, S. J., Goodson, N., & Marson, T. (2022). The prevalence of comorbidity in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *British journal of community nursing*, 27(5), 232–241. <https://doi.org/10.12968/bjcn.2022.27.5.232>
- (115) Miguel-Lavariega, D., Elizarrarás-Rivas, J., Villarreal-Ríos, E., Baltiérrez-Hoyos, R., Velasco-Tobón, U., Vargas-Daza, E. R., & Galicia-Rodríguez, L. (2023). Perfil epidemiológico de la artritis reumatoide [Epidemiological profile of rheumatoid arthritis]. *Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 61(5), 574–582. <https://doi.org/10.5281/zenodo.8316427>
- (116) Durmaz, Y., & Ilhanli, I. (2021). Rheumatoid arthritis activity scores in patients with and without fibromyalgia syndrome. *Annals of Saudi medicine*, 41(4), 246–252. <https://doi.org/10.5144/0256-4947.2021.246>
- (117) Ziegler-Heitbrock, L. (2015). Blood monocytes and their subsets: Established features and open questions. *Frontiers in Immunology*, 6, 423. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00423>

- (118) Sampath, P., Moideen, K., Ranganathan, U. D., & Bethunaickan, R. (2018). Monocyte subsets: Phenotypes and function in tuberculosis infection. *Frontiers in Immunology*, 9, 1726. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01726>
- (119) Sales, L. P., Hounkpe, B. W., Perez, M. O., Caparbo, V. F., Domiciano, D. S., Borba, E. F., et al. (2023). Transcriptomic characterization of classical monocytes highlights the involvement of immuno-inflammation in bone erosion in rheumatoid arthritis. *Frontiers in Immunology*, 14, 1251034. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1251034>
- (120) Rodríguez-Ubreva, J., de la Calle-Fabregat, C., Li, T., Ciudad, L., Ballestar, M. L., Català-Moll, F., et al. (2019). Inflammatory cytokines shape a changing DNA methylome in monocytes mirroring disease activity in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 78(11), 1505–1516. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2019-215355>
- (121) Hedman AK, Winter E, Yoosuf N, Benita Y, Berg L, Brynedal B, et al. Peripheral blood cellular dynamics of rheumatoid arthritis treatment informs about efficacy of response to disease modifying drugs. *Sci Rep*. 2023;13(1):10058. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36999-0>
- (122) Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, et al. CD14⁺,CD16⁺ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002;46(10):2578-86. <https://doi.org/10.1002/art.10545>
- (123) Cusinato M, Hadcocks L, Yona S, Planche T, Macallan D. Increased monocyte distribution width in COVID-19 and sepsis arises from a complex interplay of altered monocyte cellular size and subset frequency. *Int J Lab Hematol*. 2022;44(6):1029-39. <https://doi.org/10.1111/ijlh.13941>
- (124) Zhou, Y., Fu, B., Zheng, X., Wang, D., Zhao, C., Qi, Y., Sun, R., Tian, Z., Xu, X., & Wei, H. (2020). Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *National science review*, 7(6), 998–1002. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa041>
- (125) Zhu, H., Hu, F., Sun, X., Zhang, X., Zhu, L., Liu, X., Li, X., Xu, L., Shi, L., Gan, Y., & Su, Y. (2016). CD16⁺ Monocyte Subset Was Enriched and Functionally Exacerbated in Driving T-Cell Activation and B-Cell Response in Systemic Lupus Erythematosus. *Frontiers in immunology*, 7, 512. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00512>
- (126) Tsukamoto, M., Seta, N., Yoshimoto, K., Suzuki, K., Yamaoka, K., & Takeuchi, T. (2017). CD14^{bright}CD16⁺ intermediate monocytes are induced by interleukin-10 and

positively correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, 19(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-1216-6>

(127) Kapellos, T. S., Bonaguro, L., Gemünd, I., Reusch, N., Saglam, A., Hinkley, E. R., & Schultze, J. L. (2019). Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Frontiers in immunology*, 10, 2035. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02035>

(128) Hassan, S. Z., Gheita, T. A., Kenawy, S. A., Fahim, A. T., El-Sorougy, I. M., & Abdou, M. S. (2011). Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients: relationship to disease manifestations and activity. *International journal of rheumatic diseases*, 14(4), 325–331. <https://doi.org/10.1111/j.1756-185X.2011.01630.x>

(129) Kundu, S., Bala, A., Ghosh, P., Mukhopadhyay, D., Mitra, A., Sarkar, A., Bauri, A. K., Ghosh, A., Chattopadhyay, S., & Chatterjee, M. (2011). Attenuation of oxidative stress by allylpyrocatechol in synovial cellular infiltrate of patients with Rheumatoid Arthritis. *Free radical research*, 45(5), 518–526. <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.555480>

(130) Kundu, S., Ghosh, P., Datta, S., Ghosh, A., Chattopadhyay, S., & Chatterjee, M. (2012). Oxidative stress as a potential biomarker for determining disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Free radical research*, 46(12), 1482–1489. <https://doi.org/10.3109/10715762.2012.727991>

(131) Datta, S., Kundu, S., Ghosh, P., De, S., Ghosh, A., & Chatterjee, M. (2014). Correlation of oxidant status with oxidative tissue damage in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology*, 33(11), 1557–1564. <https://doi.org/10.1007/s10067-014-2597-z>

(132) Huang, Y. F., Lo, P. C., Yen, C. L., Nigrovic, P. A., Chao, W. C., Wang, W. Z., Hsu, G. C., Tsai, Y. S., & Shieh, C. C. (2015). Redox Regulation of Pro-IL-1 β Processing May Contribute to the Increased Severity of Serum-Induced Arthritis in NOX2-Deficient Mice. *Antioxidants & redox signaling*, 23(12), 973–984. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6136>

(133) Tardito, S., Martinelli, G., Soldano, S., Paolino, S., Pacini, G., Patane, M., Alessandri, E., Smith, V., & Cutolo, M. (2019). Macrophage M1/M2 polarization and rheumatoid arthritis: A systematic review. *Autoimmunity reviews*, 18(11), 102397. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2019.102397>

- (134) Kennedy, A., Fearon, U., Veale, D. J., & Godson, C. (2011). Macrophages in synovial inflammation. *Frontiers in immunology*, 2, 52. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00052>
- (135) van de Loo, F. A., Bennink, M. B., Arntz, O. J., Smeets, R. L., Lubberts, E., Joosten, L. A., van Lent, P. L., Coenen-de Roo, C. J., Cuzzocrea, S., Segal, B. H., Holland, S. M., & van den Berg, W. B. (2003). Deficiency of NADPH oxidase components p47phox and gp91phox caused granulomatous synovitis and increased connective tissue destruction in experimental arthritis models. *The American journal of pathology*, 163(4), 1525–1537. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63509-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63509-2)
- (136) Hultqvist, M., Olofsson, P., Holmberg, J., Bäckström, B. T., Tordsson, J., & Holmdahl, R. (2004). Enhanced autoimmunity, arthritis, and encephalomyelitis in mice with a reduced oxidative burst due to a mutation in the Ncf1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), 12646–12651. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403831101>
- (137) Liao, Y. C., Wu, S. Y., Huang, Y. F., Lo, P. C., Chan, T. Y., Chen, C. A., Wu, C. H., Hsu, C. C., Yen, C. L., Chen, P. C., & Shieh, C. C. (2021). NOX2-Deficient Neutrophils Facilitate Joint Inflammation Through Higher Pro-Inflammatory and Weakened Immune Checkpoint Activities. *Frontiers in immunology*, 12, 743030. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.743030>
- (138) Campbell, A. M., Kashgarian, M., & Shlomchik, M. J. (2012). NADPH oxidase inhibits the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Science translational medicine*, 4(157), 157ra141. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004801>
- (139) Sugimoto, Y., Endo, D., & Aratani, Y. (2021). Mice Deficient in NOX2 Display Severe Thymic Atrophy, Lymphopenia, and Reduced Lymphopoiesis in a Zymosan-Induced Model of Systemic Inflammation. *Inflammation*, 44(1), 371–382. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01342-6>
- (140) Li, P., Haque, M. A., & Blum, J. S. (2002). Role of disulfide bonds in regulating antigen processing and epitope selection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(5), 2444–2450. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.5.2444>
- (141) Savina, A., Jancic, C., Hugues, S., Guermonprez, P., Vargas, P., Moura, I. C., Lennon-Duménil, A. M., Seabra, M. C., Raposo, G., & Amigorena, S. (2006). NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell*, 126(1), 205–218. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.035>

- (142) Gelderman, K. A., Hultqvist, M., Pizzolla, A., Zhao, M., Nandakumar, K. S., Mattsson, R., & Holmdahl, R. (2007). Macrophages suppress T cell responses and arthritis development in mice by producing reactive oxygen species. *The Journal of clinical investigation*, 117(10), 3020–3028. <https://doi.org/10.1172/JCI31935>
- (143) Olofsson, P., Holmberg, J., Tordsson, J., Lu, S., Akerström, B., & Holmdahl, R. (2003). Positional identification of *Ncf1* as a gene that regulates arthritis severity in rats. *Nature genetics*, 33(1), 25–32. <https://doi.org/10.1038/ng1058>
- (144) Snelgrove, R. J., Edwards, L., Williams, A. E., Rae, A. J., & Hussell, T. (2006). In the absence of reactive oxygen species, T cells default to a Th1 phenotype and mediate protection against pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 177(8), 5509–5516. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.8.5509>
- (145) Komatsu, J., Koyama, H., Maeda, N., & Aratani, Y. (2006). Earlier onset of neutrophil-mediated inflammation in the ultraviolet-exposed skin of mice deficient in myeloperoxidase and NADPH oxidase. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 55(5), 200–206. <https://doi.org/10.1007/s00011-006-0071-3>
- (146) Snelgrove, R. J., Edwards, L., Rae, A. J., & Hussell, T. (2006). An absence of reactive oxygen species improves the resolution of lung influenza infection. *European journal of immunology*, 36(6), 1364–1373. <https://doi.org/10.1002/eji.200635977>
- (147) Kassim, S. Y., Fu, X., Liles, W. C., Shapiro, S. D., Parks, W. C., & Heinecke, J. W. (2005). NADPH oxidase restrains the matrix metalloproteinase activity of macrophages. *The Journal of biological chemistry*, 280(34), 30201–30205. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503292200>
- (148) Liu, S. Y., Tsai, M. Y., Chuang, K. P., Huang, Y. F., & Shieh, C. C. (2008). Ligand binding of leukocyte integrin very late antigen-4 involves exposure of sulfhydryl groups and is subject to redox modulation. *European journal of immunology*, 38(2), 410–423. <https://doi.org/10.1002/eji.200737556>
- (149) Tao, L., Lemoff, A., Wang, G., Zarek, C., Lowe, A., Yan, N., & Reese, T. A. (2020). Reactive oxygen species oxidize STING and suppress interferon production. *eLife*, 9, e57837. <https://doi.org/10.7554/eLife.57837>
- (150) Khojah, H. M., Ahmed, S., Abdel-Rahman, M. S., & Hamza, A. B. (2016). Reactive oxygen and nitrogen species in patients with rheumatoid arthritis as potential

biomarkers for disease activity and the role of antioxidants. *Free radical biology & medicine*, 97, 285–291. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.020>

(151) Bala, A., Mondal, C., Haldar, P. K., & Khandelwal, B. (2017). Oxidative stress in inflammatory cells of patient with rheumatoid arthritis: clinical efficacy of dietary antioxidants. *Inflammopharmacology*, 25(6), 595–607. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0397-1>

(152) Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2016). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 73(17), 3221–3247. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2223-0>

(153) Olumuyiwa-Akeredolu, O. O., Page, M. J., Soma, P., & Pretorius, E. (2019). Platelets: emerging facilitators of cellular crosstalk in rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology*, 15(4), 237–248. <https://doi.org/10.1038/s41584-019-0187-9>

(154) Rolling, C. C., Barrett, T. J., & Berger, J. S. (2023). Platelet-monocyte aggregates: molecular mediators of thromboinflammation. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 10, 960398. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2023.960398>

(155) Mariscal, A., Zamora, C., Díaz-Torné, C., Ortiz, M. À., Agustín, J. J., Reina, D., Estrada, P., Moya, P., Corominas, H., & Vidal, S. (2022). Increase of Circulating Monocyte-Platelet Conjugates in Rheumatoid Arthritis Responders to IL-6 Blockage. *International journal of molecular sciences*, 23(10), 5748. <https://doi.org/10.3390/ijms23105748>

(156) Gudbrandsdottir, S., Hasselbalch, H. C., & Nielsen, C. H. (2013). Activated platelets enhance IL-10 secretion and reduce TNF- α secretion by monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(8), 4059–4067. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201103>

(157) Schwartzkopff, F., Petersen, F., Grimm, T. A., & Brandt, E. (2012). CXC chemokine ligand 4 (CXCL4) down-regulates CC chemokine receptor expression on human monocytes. *Innate immunity*, 18(1), 124–139. <https://doi.org/10.1177/1753425910388833>

(158) Zha, Q., He, Y., Lu, Y., & Lu, A. (2006). Relationship between platelet counts and cartilage erosion in 436 cases of rheumatoid arthritis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 371(1-2), 194–195. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.02.031>

(159) Gasparyan, A. Y., Ayvazyan, L., Mukanova, U., Yessirkepov, M., & Kitas, G. D. (2019). The Platelet-to-Lymphocyte Ratio as an Inflammatory Marker in Rheumatic Diseases. *Annals of laboratory medicine*, 39(4), 345–357. <https://doi.org/10.3343/alm.2019.39.4.345>

Anexos

Anexo 1. Criterios clasificatorios EULAR/ACR 2010.

1. CRITERIA

Target population (who should be tested?): patients who

- 1) have at least one joint with definite clinical synovitis (swelling)*
- 2) with the synovitis not better explained by another disease†

Classification criteria for RA (score-based algorithm: add score of categories A through D; a score of ≥ 6 out of 10 is needed for classification of a patient as having definite RA)‡

A. Joint involvement§

One large joint	0
Two to 10 large joints	1
One to three small joints (with or without involvement of large joints)	2
Four to 10 small joints (with or without involvement of large joints)	3
> 10 joints (at least one small joint)**	5

B. Serology (at least one test result is needed for classification)**

Negative RF <i>and</i> negative ACPA	0
Low positive RF <i>or</i> low positive ACPA	2
High positive RF <i>or</i> high positive ACPA	3

C. Acute phase reactants (at least one test result is needed for classification)‡‡

Normal CRP and normal ESR	0
Abnormal CRP or normal ESR	1

D. Duration of symptoms§§

< six weeks	0
$\geq$ six weeks	1

ACPA = anti-citrullinated protein antibody; CRP = C-reactive protein; ESR = erythrocyte sedimentation rate; RA = rheumatoid arthritis.

*—The criteria are aimed at classification of newly presenting patients. In addition, patients with erosive disease typical of RA with a history compatible with prior fulfillment of the 2010 criteria should be classified as having RA. Patients with long-standing disease, including those whose disease is inactive (with or without treatment), who, based on retrospectively available data, have previously fulfilled the 2010 criteria should be classified as having RA.

†—Differential diagnoses differ in patients with different presentations, but may include conditions such as systemic lupus erythematosus, psoriatic arthritis, and gout. If it is unclear about the relevant differential diagnoses to consider, an expert rheumatologist should be consulted.

‡—Although patients with a score of less than 6 out of 10 are not classifiable as having RA, their status can be reassessed, and the criteria might be fulfilled cumulatively over time.

§—Joint involvement refers to any swollen or tender joint on examination, which may be confirmed by imaging evidence of synovitis. Distal interphalangeal joints, first carpometacarpal joints, and first metatarsophalangeal joints are excluded from assessment. Categories of joint distribution are classified according to the location and number of involved joints, with placement into the highest category possible based on the pattern of joint involvement.

||—“Large joints” refers to shoulders, elbows, hips, knees, and ankles.

¶—“Small joints” refers to the metacarpophalangeal joints, proximal interphalangeal joints, second to fifth metatarsophalangeal joints, thumb interphalangeal joints, and wrists.

**—In this category, at least one of the involved joints must be a small joint; the other joints can include any combination of large and additional small joints, as well as other joints not specifically listed elsewhere (e.g., temporomandibular, acromioclavicular, sternoclavicular).

††—Negative refers to international unit values that are less than or equal to the upper limit of normal for the laboratory and assay; low positive refers to international unit values that are higher than the upper limit of normal but three or less times the upper limit of normal for the laboratory and assay; high positive refers to international unit values that are more than three times the upper limit of normal for the laboratory and assay. When rheumatoid factor information is only available as positive or negative, a positive result should be scored as low positive for rheumatoid factor.

‡‡—Normal/abnormal is determined by local laboratory standards.

§§—Duration of symptoms refers to patient self-report of the duration of signs or symptoms of synovitis (e.g., pain, swelling, tenderness) of joints that are clinically involved at the time of assessment, regardless of treatment status.

Adapted with permission from Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative [published correction appears in Ann Rheum Dis. 2010;69(10):1892]. Ann Rheum Dis . 2010;69(9):1583

Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A. J., Funovits, J., Felson, D. T., Bingham, C. O., 3rd, Birnbaum, N. S., Burmester, G. R., Bykerk, V. P., Cohen, M. D., Combe, B., Costenbader, K. H., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J. M., Hobbs, K., Huizinga, T. W., Kavanaugh, A., Kay, J., ... Hawker, G. (2010). 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Annals of the rheumatic diseases*, 69(9), 1580–1588. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.138461>

Anexo 2. Aprobación CHEA



Montevideo, 28 de mayo de 2020.-

Se deja constancia que el protocolo experimental N° 1073, titulado: “Estudio de mecanismos inflamatorios en un modelo experimental de artritis reumatoide”, fue presentado para su evaluación ante la Comisión de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Medicina.

Investigador responsable del proyecto: Dra. Teresa Freire

Investigador responsable del protocolo experimental: Dra. Teresa Freire

Lic. Mariela Santos
Secretaria de la Comisión de Ética
en el Uso de Animales
Facultad de Medicina

Anexo 3. Toma de conocimiento de aprobación por consejo de Facultad de Medicina

Número	Fecha
79	05/08/2020 14:00

(Exp. N° 070153-000566-20) - Tomar conocimiento de que la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA), aprobó el protocolo de experimentación con animales titulado: "Estudio de mecanismos inflamatorios en un modelo experimental de artritis reumatoide" cuyo investigadora responsable es la Dra. **Teresa Freire**.

(7 en 7)

Anexo 4. Consentimiento Informado

Montevideo..... dede 2020

Por medio del presente documento doy mi **consentimiento** al equipo investigador para participar del estudio "**Estudio de los macrófagos en la respuesta inmune de la Artritis Reumatoide.**" Proyecto a realizarse por el equipo de la Policlínica de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas del Hospital Maciel durante el período 2020. Siendo responsables del estudio la Asist. Dra. Carolina Díaz y el Br. Pablo Lores.

El objetivo de este estudio es estudiar los factores relacionados a la inflamación producida por la Artritis Reumatoide. Para ello se recolectarán datos de la paraclínica sanguínea, junto con información aportada en la entrevista con el equipo tratante. Siendo puramente observacional y descriptivo, **sin intervenir de ninguna forma en mi tratamiento ni en la indicación de paraclínica pertinente**, permitiendo así una correcta atención médica. Este estudio requiere una punción para extracción de sangre de una vena del brazo que será realizada por personal capacitado, puede en algunos casos generar dolor leve en la zona de punción o aparición de hematoma local. Garantizando de esta forma, que **no será sometido a ningún riesgo ni daño físico mayor, como tampoco cambios en las directivas atencionales indicadas por el equipo.**

Este estudio no implica la recolección de datos que puedan ser identificatorios, manteniendo y garantizando el anonimato.

Entiendo que no existirán beneficios directos sobre mi persona o a quién represento. También entiendo que si decido no continuar con el estudio, mis datos serán eliminados, las consecuencias son ajenas del actuar de mi médico tratante, sin que ello signifique pérdida de mis derechos a la atención profesional.

El equipo investigador me ha proporcionado en forma escrita, he leído o se me ha leído y he entendido completamente la naturaleza y los propósitos del estudio y me ha informado la metodología, los riesgos y beneficios que del estudio pudieran desprenderse. Entiendo que no recibiré ninguna compensación económica por formar parte del estudio. Se me han sido aclaradas las dudas presentadas en forma personalizada y he comprendido lo que se me ha explicado y contestado. Asimismo el equipo me ha confirmado que podré contactarme con ellos en el caso de que se me presenten nuevas dudas durante la investigación.

Dejo constancia que **me encuentro suficientemente asesorado y consiento voluntariamente** en uso de mis derechos de autonomía y en pleno goce de mis facultades a integrar este estudio, tal como me ha sido propuesto.

Nombre del participante:.....

Teléfono:.....

Dirección:.....

Firma del participante o representante:.....

Contacto telefónico: Hospital Maciel 2 915 3000 interno 1227 (Clínica Médica 3)

Anexo 5. Hoja de información para el paciente

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmunitaria sistémica (EAS) en la cual existe una pérdida de la regulación del sistema inmunitario. La predisposición genética y los factores del ambiente son claves para el inicio y desarrollo de la enfermedad. Clínicamente se caracterizan por afectar múltiples órganos en forma aditiva, sucesiva o simultánea, requiriendo para su diagnóstico y tratamiento una atención en equipo.

La AR se define como una poliartritis crónica, erosiva, con compromiso principalmente de manos y pies, evolucionando en empujes y remisiones, generando deformidad, y secuelas con discapacidad a largo plazo **sin tratamiento**. Es la artritis más frecuentemente observada hasta en un 1 de cada 100 personas. Es más frecuentes en mujeres en edad fértil. En Uruguay, hasta la fecha, no contamos con datos a nivel nacional de incidencia y prevalencia, así como tampoco datos asociados a mortalidad, morbilidad y costos sanitarios para AR.

Es frecuente y conocida la asociación entre EAS primarias, constituyendo los síndromes de solapamiento, cuando cumplen criterios clasificatorios propuestos por los distintos colegios internacionales. Un ejemplo clásico es el *Ruphus*, constituido por la asociación de Lupus Eritematoso Sistémico y AR. Es fundamental un seguimiento adecuado tanto clínico como analítico y el control de los eventos adversos del tratamiento. Actualmente existen varios fármacos eficaces para el tratamiento de estas enfermedades, así como nuevas terapias biológicas.

Esta investigación tiene por objetivo estudiar de forma más específica la inflamación generada por la AR. Mediante una entrevista breve y los datos aportados por la consulta, llenaremos un formulario que nos permita registrar datos como la actividad de la enfermedad, su evolución y los tratamientos recibidos. Además anotaremos los datos de la paraclínica solicitada durante los controles en la policlínica.

Este estudio requiere una punción para extracción de sangre de una vena del brazo que será realizada por personal capacitado, puede en algunos casos generar dolor leve en la zona de punción o aparición de hematoma local. Como se mencionó en el consentimiento informado firmado por usted, sus datos se encuentran resguardados y anonimizados resguardando el derecho de confidencialidad y privacidad del paciente, disminuyendo los posibles riesgos morales. Agradecemos su participación en esta investigación y nos encontramos a su disposición para cualquier duda o comentario.

Saluda atentamente. Equipo de la policlínica de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas del Hospital Maciel

Anexo 6. Formulario de recolección de datos

Nombre y Apellido : _____

Fecha: ____/____/____

N° de registro: _____ Contacto: _____

Sexo: M / F Edad: _____

Solapamiento	Si - 1	No - 0
LES		
SS		
SAAF		
Otra:		

Tiempo de evolución: _____ Fecha de diagnóstico: _____

Actividad (según corresponda): DAS28 N° _____ Categoría _____

Fármacos		Si - 1	No - 0
Prednisona	Dosis:		
Metotrexate	Dosis:		
Sulfazalasina			
Micofenolato			
Hidroxiclороquina			
Leflunomida			
Otro:			
Biológicos		Si -1	No - 0
Rituximab			
Adalimumab			
Inflixumab			
Etanecept			
Tocilizumab			
Otro:			

CDAI N°.....

Categoría

Número de muestra:

Observaciones:.....

.....

Anexo 7. Aprobación comité de ética del Hospital Maciel

Comité de Ética de la Investigación del Hospital Maciel
C.E.I.H.M
Informe del Evaluación de protocolos de Investigación

Título de la Investigación	"Estudio de los macrófagos en la respuesta inflamatoria de Artritis Reumatoide".
Protocolo de la Investigación	Nº32
Nombre y Título del solicitante	Dra. Carolina Díaz, Br. Pablo Lores
Nombre de la Institución y sede de la Investigación	Hospital Maciel
Lugar y Fecha de la decisión	12/08/2020

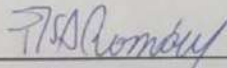
Declaración de la decisión tomada

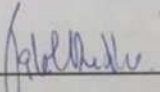
Protocolo aprobado	Aprobado
Protocolo rechazado	
Solicitud de enmiendas	
Aprobación con recomendación	
Aprobación con condicionamiento	

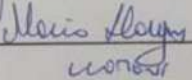
Observaciones

- Se solicita a los investigadores: Ítem de Aspectos Éticos y agregar en el mismo compromiso de investigadores con la Declaración de Helsinki y del Decreto 379/08.
- Bibliografía Nacional.

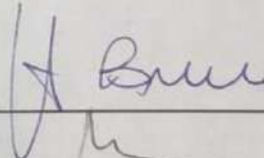
Firmas de los integrantes del CEIHM

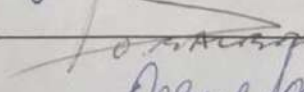


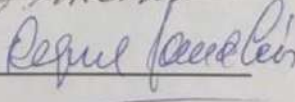




carolina







Regue

COMITÉ DE BIOÉTICA
HOSPITAL MACIEL-ASSE

Anexo 8. Datos clínicos tabulados modelo murino de CIA tabulados

Variable al día 58	Grupo	Dist. Normal	Mediana	Media	SD	Test	Valor P	Resumen
PMI Ajustado (mm/x 10 ⁻² g)	AR	No	5.2	5.3	1.1	No paramétrico	0.1026	ns
	CTRL	Si	4.7	4.7	0.41			
PMS Ajustado (mm/x 10 ⁻² g)	AR	No	3.4	3.5	0.8	No paramétrico	0.4349	ns
	CTRL	Si	3.2	3.2	0.27			
PT Ajustado (mm/x 10 ⁻² g)	AR	Si	4.3	4.3	0.60	Paramétrico	0.1128	ns
	CTRL	Si	3.9	3.9	0.33			
ST Final	AR	No	1.0	1.6	1.9	No paramétrico	0.0661	*

Anexo 9. Estrategia de gating para FACS

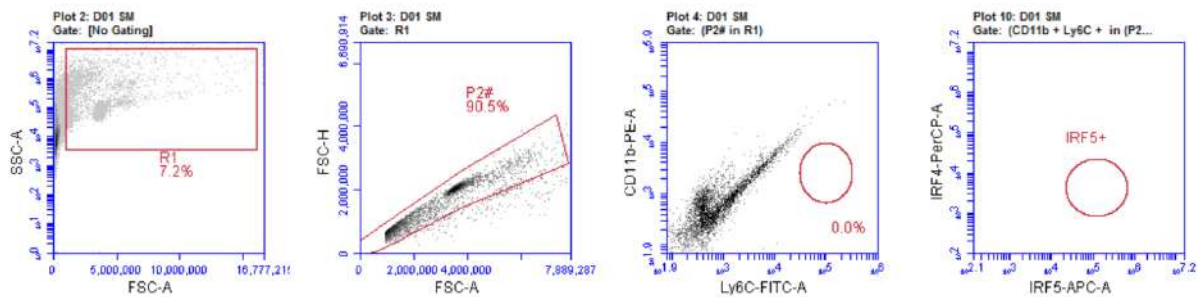
En este caso trabajamos con tres anticuerpos conjugados a fluoróforos específicos para marcar células circulantes en sangre de ratones artríticos. Se adjunta cada target del anticuerpo y el canal en cual es detectado según la longitud de onda correspondiente:

Ly6C - FITC

CD11b - PE

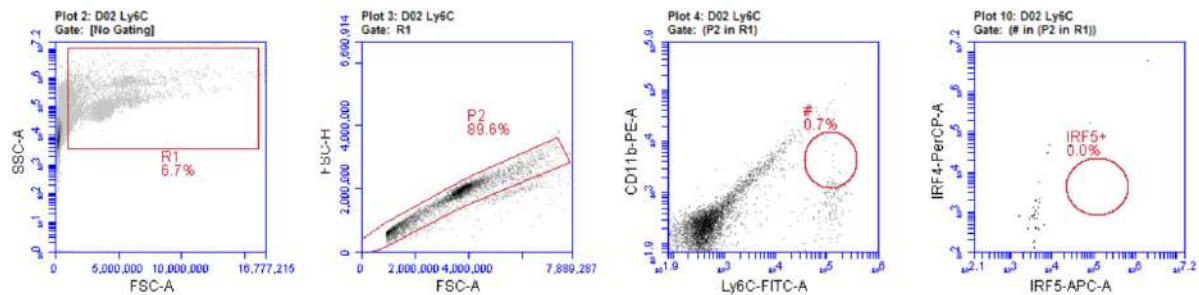
IRF5 - APC

Posterior a la compensación, en primer lugar veremos el control **Sin marcación**:



Analizaremos los controles mono-marcas para cada anticuerpo a nivel de definir la población single positiva para cada una, determinando en los ejes correspondientes, donde colocar la gate de la población positiva.

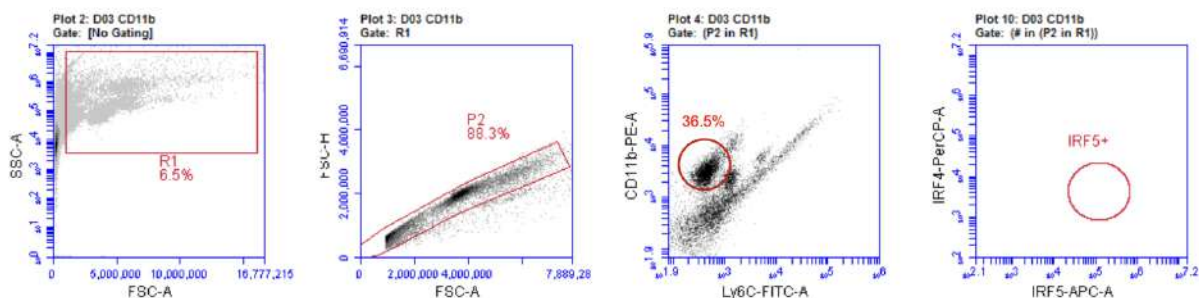
Ly6C: en este caso la marcación fue escasa (0.7%). pero por como se ve en las muestras y el resto de los controles definimos esta gate.



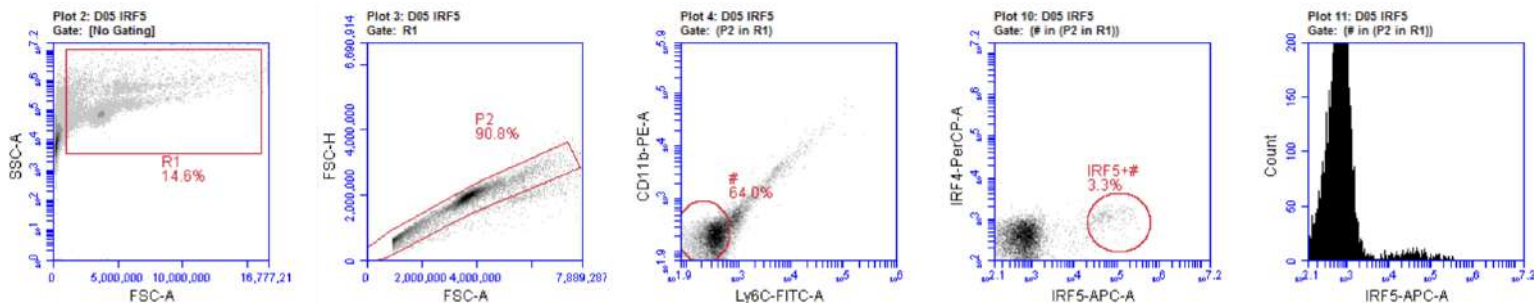
CD11b:

sin

problemas.

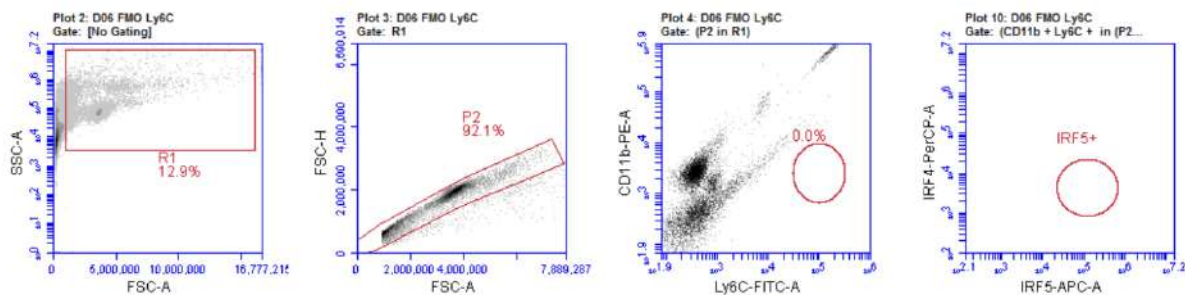


IRF5: En este caso nos interesaba marcar la población $CD11b^+ IRF5^+$ por lo que gateamos especialmente en las $CD11b^+$ para luego detectar la población $IRF5^+$. Donde además también interesa medir la expresión de dicho marcador en el último histograma.

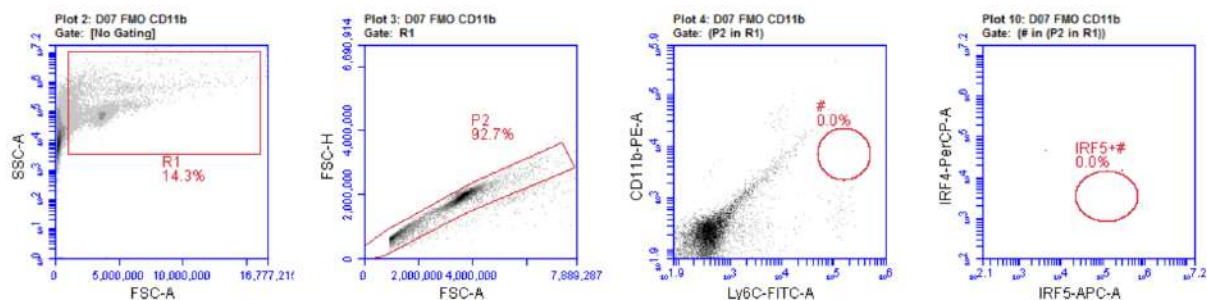


Ahora pasaremos a ver los FMO para cada uno de los anticuerpos, según está ejemplificado en el texto principal.

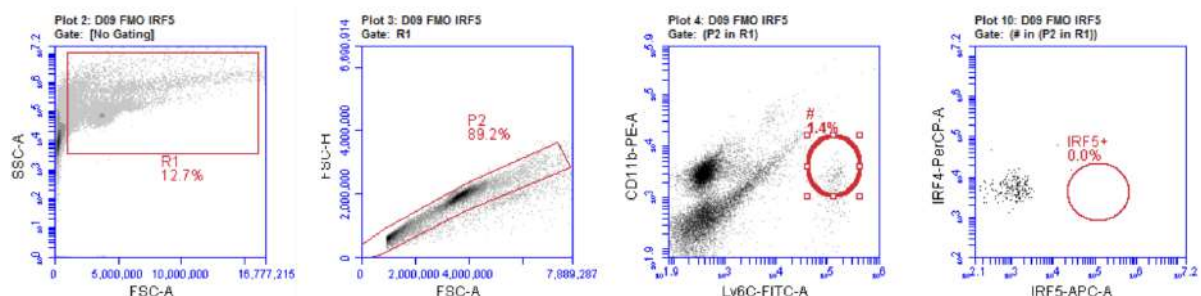
FMO-Ly6C:



FMO-CD11b:



FMO-IRF5:



Por último, adjunto como se ve la adquisición para un ratón artrítico según las gates establecidas previamente.

