UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

"EFECTO DEL RECEPTOR SEROTONINÉRGICO 5-HT_{5A} EN LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS, EN MUESTRAS DE LINFOCITOS DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE"

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

Q.F.B. ALFREDO RODRÍGUEZ CRUZ

DIRIGIDA POR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
SEPTIEMBRE 2015
México

REPOSITORIO INSTITUCIONAL DGBSDI-UAQ

La presente obra está bajo la licencia:
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es

CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:

Atribución — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.

NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .

SinDerivadas — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad, o derechos morales pueden limitar la forma en que utilice el material.

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencias Químico Biológicas

"EFECTO DEL RECEPTOR SEROTONINÉRGICO 5-HT_{5A} EN LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS, EN MUESTRAS DE LINFOCITOS DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE"

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Químico Biológicas
Presenta:
Q.F.B. Alfredo Rodríguez Cruz

Dirigido por:
Dra. Laura Cristina Berumen Segura

SINODALES

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Presidente — Firma

Dra. María Guadalupe Garcia Alcocer
Secretario — Firma

Dra. Adriana Jheny Rodríguez Méndez
Vocal — Firma

Dr. Mamadou Moustapha Bah
Suplente — Firma

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera
Suplente — Firma

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad de Química

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
SEPTIEMBRE 2015
México

RESUMEN

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica, caracterizada por una inflamación severa, dolor articular, así como destrucción de articulaciones sinoviales, lo cual conduce a una discapacidad severa y mortalidad prematura. El pronóstico de la artritis reumatoide suele ser muy variable, debido a que se correlacionan diversos factores, entre ellos: la presencia del factor reumatoide, el genotipo del antígeno leucocitario humano (HLA), erosiones articulares tempranas, el número de articulaciones implicadas, presencia de una discapacidad temprana, la edad de inicio de los síntomas, así como la presencia de manifestaciones extra-articulares. Los tratamientos con los que actualmente se cuenta, van dirigidos principalmente a resolver los signos y síntomas, restaurar la función física y prevenir el desarrollo de daño en las articulaciones, o en caso de que exista daño, para aminorar o detener la progresión de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de la disponibilidad actual de una amplia gama de fármacos y agentes biológicos (utilizados ya sea individualmente o en combinación), puede que no sea posible lograr una remisión completa, por ello la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas cada vez se hace más recurrente. El objetivo de este trabajo consistió en encontrar las bases moleculares para saber más sobre la función del receptor serotoninérgico 5-$HT_{5A,}$ en PBMC de pacientes con artritis reumatoide, evaluando el efecto de un agonista parcial (ácido valerénico) del receptor 5-HT_{5A} sobre la proliferación celular, así como, la expresión de dicho receptor y su efecto sobre citocinas proinflamatorias IL-6, IL-1 y TNF-α. Se evaluó el mismo efecto en una línea celular específica linfoide T Jurkat. Los resultados obtenidos indican que el ácido valerénico como agonista parcial del receptor 5-HT_{5A} es capaz de inhibir la proliferación celular a concentraciones mM, observando disminución en los niveles de IL-6.

(**Palabras clave:** Artritis Reumatoide, 5-HT_{5A}, linfocitos, ácido valerénico, citocina)

SUMMARY

Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory disease characterized by severe inflammation, synovial joint pain and destruction, which leads to severe disability and premature mortality. The prognosis of rheumatoid arthritis is often highly variable, because several involved factors are correlated, including: the presence of rheumatoid factor, genotype human leukocyte antigen (HLA), early joint erosions and number of joints involved, presence of early disability, age of onset of symptoms, and the presence of extra-articular manifestations. Treatments which currently have intended primarily to address the signs and symptoms, restore physical function and prevent the development of joint damage, or if there is damage to slow or stop the progression of the disease. However, despite the current availability of a wide range of drugs and biological agents (used either individually or in combination), it may not be possible to achieve a complete remission, so the search for new therapeutic alternatives is becoming most recurrent. The aim of this work was to find the molecular basis to learn more about the function of serotonin receptor 5-HT_{5A} in PBMC from patients with rheumatoid arthritis, evaluating the effect of a partial agonist (valerenic acid) of the 5-HT_{5A} on cell proliferation, the expression of this receptor and its effect on proinflammatory cytokines like IL-6, IL-1 and TNF-α. The same effect was assessed in a specific T lymphoid cell line Jurkat. The results indicate that the valerenic acid as a partial agonist of the 5-HT5A is able to inhibit cell proliferation at concentrations mM, having decreased levels of IL-6.

(**Key words**: Rheumatoid Arthritis 5-HT_{5A}, lymphocytes, valerenic acid, cytocine)

DEDICATORIA

Primeramente a Dios, quien me sustenta para llevar a cabo cada una de mis metas, quien es él que hace que todo sea posible.

A mis padres, quienes siempre me impulsan y apoyan con amor y comprensión, a ustedes que la mayor satisfacción como padres sea el sentirse orgullosos de haberme formado como persona.

A Sharon, quien me enseñado el significado de amar, con su cariño y comprensión, pero sobre todo el apoyo cada día que la eh necesitado.

A mi familia con amor.

“Mas buscad primeramente el reino de Dios y su justicia, y todas estas cosas os serán añadidas” Mateo 6:33

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento económico para la realización de esta proyecto de investigación (número de beca: 298061), numero FOMIX M0016-2014-03 250289.

A la Dra. Laura Cristina Berumen Segura por su compromiso con mi crecimiento profesional e intelectual, su voluntad y paciencia, por su enorme sabiduría, su nobleza y exigencia, le guardo cariño, admiración y sobre todo agradecimiento.

A la Dra. María Guadalupe García Alcocer por su cariño, su confianza, pero sobre todo su apoyo, a quien admiro y guardo un enorme respeto y admiración.

A la Dra. Jesica Esther Escobar, Dra. Adriana Jheny y el Dr. Moustapha por su apoyo académico en la realización de este proyecto.

A la Unidad de Investigación Genética por su apoyo académico, intelectual y personal, en especial agradezco a Karla Padilla, Jesús Mendiola, Irasema Mendieta quienes han sido parte importante en mi proyecto y por su amistad incondicional.

A la comunidad de Puerto Blanco, San José Iturbide, Guanajuato por su hospitalidad y su disponibilidad para participar en este proyecto.

A la Dra. Lizbeth Tinajero por su atención, orientación y disponibilidad para el asesoramiento médico.

A Valeria Caltzontzin Rabell por el apoyo y soporte técnico brindado durante la realización de metodológica.

A mis compañeros de la Maestría en Ciencias Químico Biológicas, Ronna, Jesús, Alma, Lupita, Mariana y Juliana, por su apoyo, compañerismo y amistad brindada

ÍNDICE GENERAL

Contenido **Página**

RESUMEN

SUMMARY

ÍNDICE DE CUADROS iii

ÍNDICE DE FIGURAS iv

1. INTRODUCCIÓN 1

2. ANTECEDENTES 2

2.1. Artritis 2

2.1.1. Síntomas de Artritis 3

2.1.2. Tipos de Artritis 4

2.2. Artritis Reumatoide 5

2.3. Factores Genéticos de la Artritis Reumatoide 6

2.4. Fisiopatología de la Artritis Reumatoide 11

2.4.1. Anticuerpos presentes en la Artritis Reumatoide 11

2.4.2. Proceso Inmunológico Sinovial e Inflamación 12

2.4.3. Citocinas y Factores de crecimiento 15

2.5. Receptores Serotoninérgicos en Artritis Reumatoide 18

2.6. Manifestaciones Clínicas 20

2.7. Epidemiología e Incidencia 21

2.7.1. Prevalencia de la Artritis Reumatoide 22

2.7.2. Tendencia temporal en incidencia y prevalencia de Artritis Reumatoide . 23

2.7.3. Mortalidad y Supervivencia 24

2.8. Diagnóstico 24

2.9. Terapias 26

3. JUSTIFICACIÓN 30

4. HIPÓTESIS 32

5. OBJETIVOS 33

5.1. General 33

5.2. Específicos 33

6. MATERIALES Y MÉTODOS 34

6.1. Equipos 34
6.2. Materiales y Reactivos 34
6.3. Material Biológico 35
6.4. Cultivo Celular 36
6.5. Extracción de Proteínas 37
6.6. Cuantificación de Proteínas 37
6.7. *Western Blot* 38
6.7.1. SDS-PAGE 38
6.7.2. Electrotransferencia de Proteínas 39
6.7.3. Ensayo con Quimioluminiscencia 40
6.8. Cuantificación de IL-1, IL-6 y TNF-α 40
6.8.1. Cuantificación de IL-1 41
6.8.2. Cuantificación de IL-6 41
6.8.3. Cuantificación de TNF- α 42
7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO 43
8. RESULTADOS 44
8.1. Características clínicas de los participantes en el estudio. 44
8.2. Evaluación del efecto de la serotonina y ácido valerénico en cultivo celular de linfocitos de sujetos sanos. 44
8.3. Evaluación del efecto del ácido valerénico en cultivo celular de linfocitos de pacientes con artritis reumatoide y células Jurkat. 46
8.4. Evaluación de la expresión de la proteína del receptor 5-HT_{5A} en muestras de linfocitos de pacientes con artritis reumatoide. 47
8.5. Determinación de los niveles de citocinas proinflamatorias por efecto del ácido valerénico en los cultivos de linfocitos de pacientes con artritis reumatoide en comparación con sujetos sanos. 49
9. DISCUSIÓN 54
10. CONCLUSIONES 61
11. REFERENCIAS 62
12. ANEXOS 73
13. APÉNDICE 78

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Genes candidatos con polimorfismos del nucleótido único (SNP) vinculados a la artritis reumatoide y su función potencial en la patogénesis.	8
2	Citocinas clave implicadas en la patogénesis de la artritis reumatoide.	17
3	Tasas de Prevalencia e Incidencia de artritis reumatoide en todo el mundo (casos por cada 100 habitantes).	23
4	Medicamentos para el tratamiento de artritis reumatoide.	28
5	Diluciones para la preparación de la curva de calibración de cuantificación de proteínas.	38
6	Sumario clínico de participantes en el estudio.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Localización de la inflamación en la artritis.	2
2	Múltiples progresiones para el desarrollo de la artritis reumatoide.	10
3	Proceso de Inmunidad Adaptativa e Innata dentro de las articulaciones con Artritis Reumatoide.	14
4	Prevalencia de articulaciones afectadas en la artritis reumatoide	21
5	Clasificación convencional y nueva de criterios para artritis reumatoide.	26
6	Efecto de la serotonina en la proliferación celular de linfocitos.	45
7	Efecto del ácido valerénico en la proliferación celular de linfocitos.	45
8	Efecto del ácido valerénico en la proliferación celular de linfocitos de pacientes con artritis reumatoide.	46
9	Porcentaje de inhibición de la proliferación de células T linea tipo Jurkat tratadas con ácido valerénico.	47
10	Western Blot del receptor 5-HT_{5A} en linfocitos de pacientes con artritis reumatoide y sujetos sanos, tratados con ácido valerénico.	48
11	Western Blot del receptor 5-HT_{5A} en células T linea tipo Jurkat tratadas con ácido valerénico.	49
12	Expresión de citocina proinflamatoria IL-6 en linfocitos de sujetos sanos y pacientes con artritis reumatoide, tratados con ácido valerénico.	50
13	Expresión de TNF-α en linfocitos de sujetos sanos y pacientes con artritis reumatoide, tratados con ácido valerénico.	51
14	Expresión de TNF-α en linfocitos de sujetos sanos y pacientes con artritis reumatoide, tratados con ácido valerénico.	52
15	Expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF-α) en linfocitos de células T tipo Jurkat, tratados con ácido valerénico.	53
16	Posible Mecanismo de acción del ácido valerénico a través de los receptores 5-HT_{5A} y 5-HT_{2B} (Modificado de Fraser, 2008).	60

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades reumáticas cada vez son más significativas en nuestra sociedad, con un predominio mayor en México, comparado con otros países subdesarrollados y desarrollados. La prevalencia total de enfermedades reumáticas es cercana al 14.5%, siendo la osteoartritis la de mayor con 10.5%; por su parte la artritis reumatoide (AR) tiene una presenta en promedio 1.6%.

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta la membrana sinovial, al provocar daños en las articulaciones y la destrucción ósea, causa una discapacidad grave, disminuyendo la calidad de vida del paciente. Aunado a ello, se cree que la osteoartritis (principal padecimiento reumático de nuestro país) podría derivarse de una artritis reumatoide muy avanzada, debido a que a partir del daño sinovial, podría desencadenarse el daño del tejido óseo por la acción de los osteoclastos (Lefévre *et al*., 2009).

Además, la artritis reumatoide depende de diversos factores tanto genéticos como ambientales; por lo tanto no sería fácil erradicarla por completo. Sin embargo, hoy en día, se busca llevarla a un buen control sobre todo en el proceso inflamatorio, del cual se derivan la mayor parte de las afectaciones de dicha patología.

Actualmente, existen diversas terapias que disminuyen los síntomas de la AR, sin embargo, la adaptación del sistema inmune conlleva a que muchas de estas terapias con el tiempo sean poco efectivas, por lo cual, el control de la AR ha obligado a buscar nuevas alternativas con tratamientos biológicos que se enfoquen en el control de los procesos proinflamatorios, con el fin de prevenir la inflamación así como sus reacciones adversas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Artritis

El término artritis no se refiere a una sola enfermedad. Dicho término es utilizado para definir más de 100 patologías de diferente etiología en las que el proceso desencadene inflamación. La palabra artritis se deriva del griego "*arthros"* que significa articulación y el sufijo "*itis"* que define inflamación, de tal forma que artritis se define como "inflamación de una articulación". Esto es la clave para diferenciarla de otras enfermedades, como por ejemplo la artrosis, en la cual la inflamación no es el elemento importante. En las articulaciones, los extremos de los huesos están cubiertos por cartílago, y todo ello está cerrado por un tejido conocido como membrana sinovial. En esta membrana es donde se asienta la inflamación en la artritis, aunque posteriormente puede lesionar el resto de las estructuras articulares (Figura 1). De esta forma, se produce inestabilidad y deformidad de la articulación y, como consecuencia, incapacidad funcional para la realización de tareas que impliquen la flexión de articulaciones.

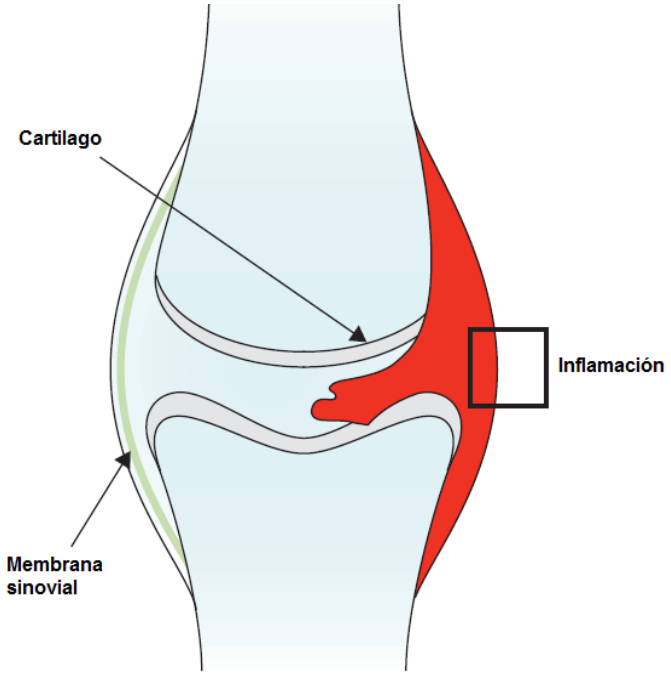

Figura 1. Localización de la inflamación en la artritis (Modificado de Scott *et al*., 2010).

Generalmente, en la mayor parte de los casos, el motivo de la aparición de una artritis es desconocido; esto se debe a que existen tantos tipos diferentes de artritis y una multitud de causas distintas. La artritis puede afectar a todos los segmentos de la población, desde los infantes hasta los adultos. Algunas artritis se curan, incluso espontáneamente, pero otras muchas son crónicas y progresivas si no se suministra un tratamiento. Por ello, es importante buscar la atención de un reumatólogo cuando se padece esta enfermedad, para que éste determine qué tipo de artritis se padece y cuál es el mejor tratamiento. Algunos pacientes con artritis pueden presentar afectación de otros órganos y sistemas, incluyendo riñones, pulmones, sistema nervioso o la piel. En estos pacientes, la inflamación se produce de forma generalizada en las articulaciones y órganos vitales con el consiguiente deterioro de la salud (Tornero, 2006).

2.1.1. Síntomas de Artritis

Los pacientes con artritis suelen presentar síntomas articulares comunes en un gran número de casos, pero que no son fáciles de diferenciar de los síntomas que tienen otras enfermedades reumáticas. El más frecuente es la presencia de dolor inflamatorio; es decir, dolor que mejora con los movimientos pero empeora con el reposo especialmente con el nocturno, por lo que en muchas ocasiones interfiere con el sueño, mostrando frecuentemente una rigidez matutina de las articulaciones dañadas; esta rigidez matutina es prolongada y suele persistir más de media hora, a diferencia de la que presenta la artrosis que es de más corta duración. El dolor presente en la artritis es diferente al que se presenta en la artrosis, que empeora con los movimientos y mejora con el reposo, y al que se denomina dolor mecánico. Ademas, presentan generalmente una disminución de la capacidad de movimiento de las articulaciones afectadas. Cuando la intensidad del dolor es alta y la inflamación mantenida, podemos encontrar alteraciones generales tales como: fiebre o febrícula, cansancio y fatiga, pérdida del apetito y adelgazamiento. En cualquiera de los casos, el proceso inflamatorio puede ser susceptible de

presentar un alivio completo sin un daño residual, tras el proceso inflamatorio; sin embargo, en otras situaciones, el propio mecanismo de desencadenamiento de la artritis puede generar una lesión y sus secuelas pueden producir un daño estructural (Naranjo, 2006).

2.1.2. Tipos de Artritis

La clasificación de la artritis se lleva acabo según su extensión y su forma de aparición, con el objeto de conocer la causa que la motiva. Cuando la artritis afecta a una sola articulación, se denomina monoartritis. En estos casos, el reumatólogo busca la posibilidad de que la artritis pueda ser causada por un germen, es decir que se trate de una artritis infecciosa. La fiebre de malta, la tuberculosis, la infección con algunas bacterias e incluso virus pueden ser responsables del cuadro, siendo poco probable que la causa sea por hongos o parásitos. También las monoartritis, con frecuencia, están motivadas por enfermedades de causa metabólica, como la gota o la condrocalcinosis (Tornero, 2006).

Cuando la afectación se presenta en 2 o 3 articulaciones, se conoce como oligoartritis; y si se afectan 4 o más articulaciones se denomina poliartritis. En estas situaciones, es importante conocer si su aparición ha sido brusca y reciente (artritis agudas) que pueden estar también en relación con la presencia de infecciones presentes o pasadas, o bien persisten hace más de 3 meses, en cuyo caso se habla de artritis crónicas, las cuales con frecuencia, son debidas a enfermedades reumáticas de tipo autoinmune (en las que el organismo reacciona contra sus propios componentes), como la artritis reumatoide, la artritis psoriática, el lupus eritematoso, entre otras (Tornero, 2006).

2.2. Artritis Reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por inflamación, dolor articular y destrucción de las articulaciones sinoviales, lo que conduce a una discapacidad severa y mortalidad prematura. Dada la presencia de autoanticuerpos, tales como el factor reumatoide (FR) y el anticuerpo anti-proteínas citrulinadas (ACPA) (diagnosticado como anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados [anti-CCP]), que puede preceder a la manifestación clínica de la AR por muchos años, ésta se considera una enfermedad autoinmune. La autoinmunidad y la unidad de carga inflamatoria sistémica y articular se asocian a una discapacidad progresiva global con complicaciones sistémicas y manifestaciones articulares y extra-articulares (nódulos, debilidad muscular, enfermedades cutáneas, manifestaciones oculares, pulmonares, cardiacas, renales, del tracto gastrointestinal, afectación en sistema nervioso, vasculitis, entre otras patologías). Sin embargo, a pesar de los cambios estructurales, que pueden ser visualizados por radiografía convencional u otras técnicas de imagen, la AR no se distingue mejor que otros trastornos artríticos, debido a que el daño articular no suele ser evidente en las primeras etapas de la enfermedad, sino que se acumula constantemente con el tiempo (Khurana y Berney, 2005; Aletaha *et al*., 2010).

El pronóstico de la AR suele ser muy variable, debido a que se correlaciona con varios factores, entre ellos la presencia del factor reumatoide, el genotipo de antígeno leucocitario humano (HLA), erosiones articulares tempranas, el número de articulaciones implicadas, presencia de una discapacidad temprana, la edad de inicio de los síntomas, así como la presencia de manifestaciones extra-articulares. Por ello, la supervivencia es consistentemente más baja que la de la población en general y se basa principalmente en la presencia de manifestaciones extra-articulares como daño de tejido pulmonar, cardiovascular y en sistema nervioso central (Khurana y Berney, 2005).

Los criterios desarrollados por el Colegio Americano de Reumatología (ACR por sus siglas en inglés) en 1987 para el diagnóstico de AR presentan una sensibilidad

de 91-94% y especificidad del 89%, donde cuatro de los siguientes siete criterios son necesarios: rigidez matutina, artritis de tres o más zonas comunes, artritis en articulaciones de las manos, artritis simétrica, nódulos reumatoides, factor reumatoide positivo en suero, y los cambios radiográficos incluyendo erosiones y descalcificaciones óseas (Arnett *et al*., 1988). Sin embargo, en 2010, estos criterios fueron replanteados por la Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR, por sus siglas en inglés), con el fin de poder diagnosticar a los pacientes con artritis temprana, los cuales no eran considerados en los criterios de 1987. Dichos criterios contemplan 4 puntos generales: afectación articular, serología (el factor reumatoide y los anticuerpos anti-proteínas citrulinadas), reactantes de fase aguda y duración de síntomas. Dichos criterios en conjunto suman un puntaje máximo escalado de 10, para el cual se ha determinado un umbral de corte de 6 puntos para poder considerar que el paciente presenta AR (Aletaha *et al*., 2010).

2.3. Factores Genéticos de la Artritis Reumatoide

La artritis reumatoide implica una compleja interacción entre la predisposición genética y desencadenantes ambientales. Un estudio en gemelos determinó la existencia de factores genéticos en la artritis reumatoide, con tasas de concordancia del 15 al 30% en gemelos monocigotos, y un 5% en los gemelos dicigóticos (MacGregor *et al*., 2000). La presencia del antígeno leucocitario humano HLA-DRB1, ha sido confirmada en los pacientes que son positivos para el factor reumatoide o ACPA; estos alelos contienen una secuencia de cinco aminoácidos (QKRAA) en las posiciones 70 a 74 del HLA-DRB1, denominado epítope compartido, que confiere particular susceptibilidad a la artritis. Los antígenos son codificados principalmente por los genes HLA-DRB1*0101, *0404, *0405, *0408, * 0410, * 0401 y * 1001. Estos hallazgos sugieren la existencia de una predisposición en la selección del repertorio de las células T, la presentación de antígenos y la alteración en la afinidad del péptido que tiene un papel en la promoción de respuestas inmunes adaptativas autoreactivas. Otras de las

explicaciones posibles para el enlace entre la AR y el epítope compartido, incluyen mimetismo molecular del epítope compartido por las proteínas microbianas, el aumento de la senescencia de la células T inducida por moléculas de HLA que contienen epítopes compartidos, y una función potencial de señalización proinflamatoria que no está relacionada con el papel del epítope compartido en el antígeno de reconocimiento (De Almeida *et al*., 2010).

Muchos otros alelos de riesgo identificados en la AR con ACPA positivo, contribuyen funcionalmente con la regulación inmune (Cuadro 1), incluyendo el factor asociado al receptor del factor nuclear κβ (TRAF1), el componente 5 del complemento (C5) y los factores relacionados con la estimulación, la activación y la diferenciación funcional de células T (por ejemplo, PTPN22 y CTLA4) (Begovich *et al*., 2004; Kurreeman *et al*., 2007). Por otra parte, las interacciones entre algunos genes aumentan el riesgo de enfermedad, como se describe entre el gen HLA-DRB1 y PTPN22, un ejemplo de la complejidad de la red de factores de riesgo que puede ser conferido por cualquier gen dado (Källberg *et al*., 2007).

Los factores de riesgo genético para la enfermedad en pacientes con ACPA negativos, parecen ser menos importantes que los factores de pacientes ACPA positivos. Sin embargo, están implicados diferentes factores, entre ellos alelos de HLA (HLA-DRB1*03), factores de regulación de interferón (factor regulador del interferón 5), y las proteínas de unión a lectina (lectina tipo C del dominio de familia 4 miembro A) (Klareskog *et al*., 2008).

Los resultados de los estudios de las interacciones gen-ambiente complementan estas observaciones. Procesos como fumar y otras formas de estrés bronquial (exposición a la sílice), aumentan el riesgo de AR en personas con susceptibilidad de los alelos HLA-DR4. Además, el tabaquismo y los alelos HLA-DRB1 tienen una interacción sinérgica, aumentando el riesgo de tener ACPA positivos (Klareskog *et al*., 2006).

Cuadro 1. Genes candidatos con polimorfismos de nucleótido único (SNP) vinculados a la artritis reumatoide y su función potencial en la patogénesis (McInnes y Schett, 2011).

Gen candidato	Lugar SNPs	Función relevante y Patogénesis
Activación Células T		
HLA-DRB1	6p21	Alelo HLA-DRB1 (conocido como epítope compartido) participa en la presentación de antígenos de MHC, responsable de la selección del repertorio de células T. Vínculo genético más fuerte con AR.
PTPN22	1p13.2	Tirosina-fosfatasa no receptor de tipo linfoide no específico, implicado en la regulación de la activación del umbral de los linfocitos. Segundo vínculo genético más fuerte.
AFF3	2q11.2	Factor de transcripción para el desarrollo linfoide.
CD28	2q33.2	Molécula co-estimuladora para la activación de células T.
CD40	20q13.12	Molécula co-estimuladora que mejora interacciones entre células T y B, aumentando la producción de anticuerpos.
CTLA4	2q33.2	Supresor de co-estimulación que regula interacciones entre células T y células presentadoras de antígeno.
IL-2RA	10p15.1	Receptor de alta afinidad para IL-2 en subgrupos de linfocitos.
IL-2	4q27	Citocinas que regulan la activación de las células T, células T reguladoras en particular.
IL-21	4q27	Citocinas que regulan diferenciación de células T, particular Th17 y la activación de células B.
PRKCQ	10p15.1	Miembro de la familia de Proteincinasa C que regula células T y activación de macrófagos.
STAT4	2q32.3	Transductor de señales de citocinas que regulan la proliferación, supervivencia y diferenciación de linfocitos.
TAGAP	6q25.3	Enzima Rho-GTPasa implicada en la activación de células T.
Vía NF-κβ		
REL	2p16.1	Miembro de proto-oncogén de la familia NF-κβ que regula la actividad de leucocitos y su supervivencia.
TNFAIP3	6q23.3	Proteína de señalización y regulador negativo de TNF-α inducida por la actividad de NF-κβ.
TRAF1	9q33.1	Regulador de la superfamilia del receptor de señalización TNF-α (ej. a NF-κβ y JNK)
Otras Vías		
BLK	8p23.1	Tirosin quinasa β-linfoide involucrada en la señalización del receptor de células B y su desarrollo.
CCL21	9q13.3	Quimiocinas implicadas en la formación del centro germinal.
FCGR2A	1q23.2	Receptor de baja afinidad IgG Fc que regula la activación de macrófagos y neutrófilos, y el aclaramiento de complejos inmunes.
PADI4	1p36.2	Enzima que convierte la arginina en citrulina, la creación de autoantígenos en la artritis reumatoide.
PRDM1	6q21	Proteína que actúa como represor de la expresión del gen β-interferón.
TNFRSF14	1p36.32	Miembro de la superfamilia del receptor de TNF-α con actividad proinflamatoria.

Por lo tanto, los factores de estrés ambientales de los tejidos pulmonares y de otro tipo de barrera, pueden promover modificaciones postraduccionales, a través de peptidil arginina deiminasa de tipo IV (PADI4), que dan lugar a la alteración cuantitativa o cualitativa en citrulinación de proteínas de la mucosa. La pérdida de la tolerancia a tales neoepítopes provoca una respuesta ACPA (De Rycke *et al*., 2004). Varios anticuerpos contra proteínas citrulinadas han sido reconocidos en los ensayos de anti-CCP, incluyendo la α-enolasa, queratina, fibrinógeno, fibronectina, colágeno y vimentina. Se estima que del 43 al 63 % de los pacientes con artritis reumatoide ACPA positivos son seropositivos para α-enolasa citrulinada, que está fuertemente asociada con el HLA-DRB1*04, PTPN22 y el tabaquismo (Mahdi *et al*., 2009).

Los agentes infecciosos (citomegalovirus, especies de *Proteus* y *Escherichia coli*) y sus productos (proteínas de choque térmico) siempre se han relacionado con la artritis reumatoide, y aunque los factores desencadenantes de la AR siguen siendo difíciles de elucidar, se postula una forma de mimetismo molecular. La formación de complejos inmunes durante la infección puede desencadenar la inducción del factor reumatoide, el cual consiste en autoanticuerpos de alta afinidad contra la porción Fc de la inmunoglobulina G, que ha servido durante mucho tiempo como un marcador de diagnóstico de la artritis reumatoide y que está implicado en su patogénesis.

El riesgo de artritis reumatoide es mayor en mujeres que en hombres. Explicaciones moleculares para estos fenómenos han sido sugeridas a partir de modelos animales de inflamación, que muestran un vínculo entre el eje hipotalámico pituitario-adrenal y la producción de citocinas (Capellino *et al*., 2010). El sistema nervioso central está implicado normalmente en la regulación inmune y la homeostasis; además, las interacciones neuroinmunológicas regulan el desarrollo de la enfermedad. Estos efectos pueden operar a nivel local (varios neurotransmisores se expresan en la sinovitis, en la artritis reumatoide) o central (citocinas que son rápidamente reguladas en el hipotálamo durante la inflamación periférica). La traducción de estas observaciones a un tratamiento eficaz de la

artritis reumatoide es un reto. Los autoanticuerpos, tales como el factor reumatoide y ACPA, son a menudo detectados en pacientes con artritis temprana (fase pre-articular de la artritis reumatoide); la combinación del factor reumatoide y ACPA incrementa la especificidad de la AR (Rantapää-Dahlqvist *et al*., 2003). Es posible que las características biológicas del autoantígeno específico (es decir, la regulación del metabolismo celular en el caso de α-enolasa y la glucosa-6-fosfatasa) puedan contribuir al desarrollo de la artritis reumatoide. Otros factores posibles incluyen microvasculares locales, neurológicos, biomecánicos y mecanismos relacionados con microtraumatismos (Figura 2).

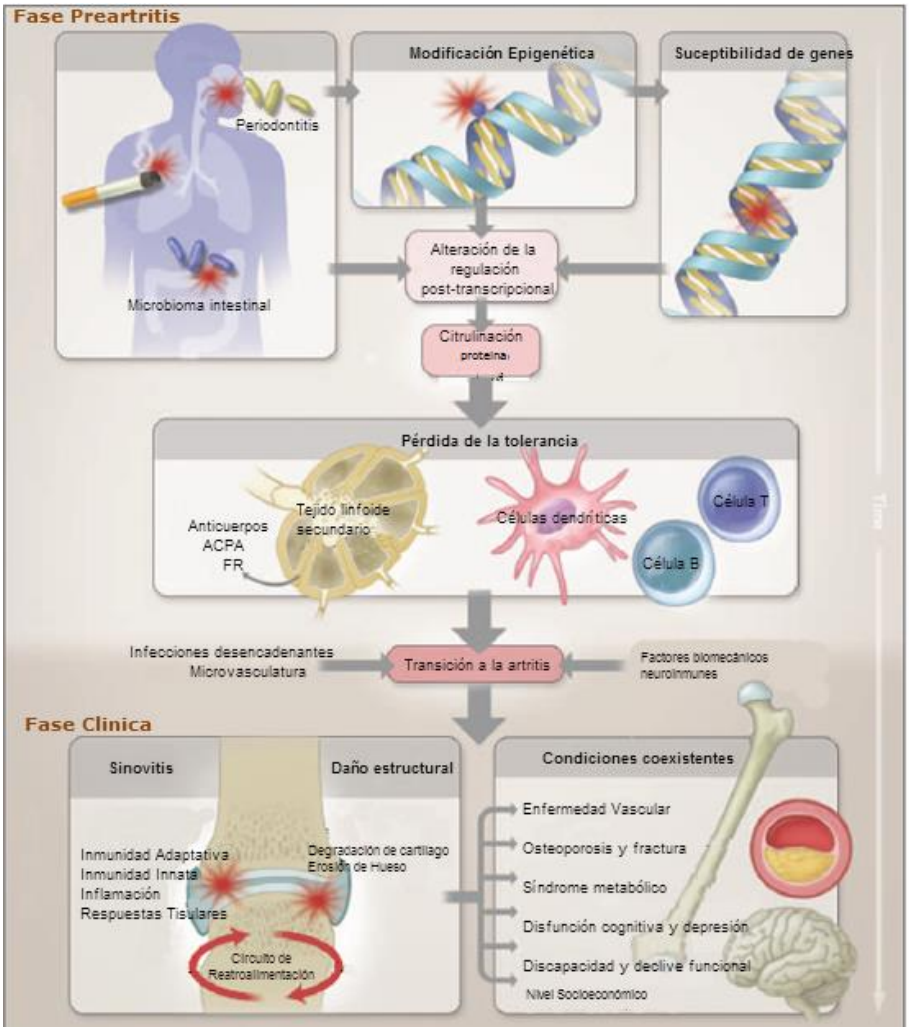

Figura 2. Múltiples progresiones para el desarrollo de la artritis reumatoide (Modificado de McInnes y Schett, 2011).

2.4. Fisiopatología de la Artritis Reumatoide

La función de los mediadores de la inflamación [citocinas, factores de crecimiento, quimiocinas, moléculas de adhesión y metaloproteinasas de matriz (MMP)] no se ha definido claramente en la patogénesis de la artritis reumatoide. Estas sustancias parecen estar implicadas en la atracción y activación de las células inmunes que contribuyen a la activación, proliferación y diferenciación fenotípica de sinoviocitos en pannus (región del tejido con inflamación granulatoria). El pannus se comporta de manera similar a un tumor localmente invasivo, el cual erosiona e invade el cartílago articular, el hueso subcondral, tendones y ligamentos. El edema de la membrana sinovial y las estructuras periarticulares contribuyen a la rigidez de la AR, al interferir con los movimientos biomecánicos habituales de las articulaciones. La rigidez aparece más pronunciada por la mañana, en parte debido a la redistribución del líquido intersticial mientras duerme la persona. Análoga a la rigidez matinal se presenta el fenómeno de gelificación, que se define como el desarrollo de la rigidez de la articulación después de la actividad (Khurana y Berney, 2005).

2.4.1. Anticuerpos presentes en la Artritis Reumatoide

El factor reumatoide es el clásico de los autoanticuerpos en la artritis reumatoide. Factores reumatoides IgM e IgA son marcadores patógenos clave dirigidos contra el fragmento Fc de la IgG. Otros tipos de anticuerpos, que se han vuelto cada vez más importantes en la AR, son los dirigidos contra péptidos citrulinados (ACPA). Aunque la mayoría de los pacientes ACPA positivos, generalmente son positivos para el factor reumatoide, los autoanticuerpos ACPA parecen ser más específicos y sensibles para el diagnóstico, además parecen ser mejores predictores de características de mal pronóstico como destrucción de articulaciones (Van der Linden *et al*., 2009). De los individuos que padecen artritis reumatoide un 80% presentan el FR-IgM, un 50% FR-IgA y un 91% ACPA positivo. La respuesta de los anticuerpos varía con el tiempo, con especificidades limitadas en la artritis

reumatoide temprana y una respuesta madura (en el que más epítopes son reconocidos y más isotipos utilizados) en la enfermedad tardía (Ioan-Facsinay *et al*., 2008). Los resultados de estudios clínicos muestran que los pacientes con artritis reumatoide que presentan ACPA positivos, tienen mayor daño sinovial que los individuos con autoanticuerpos ACPA negativos. Por ejemplo, histológicamente, las personas con enfermedad ACPA positivos tienen más linfocitos en el tejido sinovial, mientras que las personas con artritis reumatoide ACPA negativos presentan una mayor fibrosis y aumento del grosor del revestimiento. Por tal motivo, cuando la enfermedad presenta ACPA positivos, ocurre un daño sinovial mayor asociado a un daño articular y baja remisión (Van Oosterhout *et al*., 2008).

2.4.2. Proceso Inmunológico Sinovial e Inflamación

Las poblaciones de células locales dominantes en las articulaciones afectadas por artritis reumatoide son las sinoviales y las células de cartílago. Las células sinoviales se pueden dividir en tipo fibroblástico y macrófagos, como sinoviocitos. Se cree que la sobreproducción de citocinas proinflamatorias es conducida predominantemente por macrófagos sinoviales. Por lo tanto, los sinoviocitos de tipo fibroblástico muestran un comportamiento anormal en la artritis reumatoide. En modelos experimentales, la co-implantación de fibroblastos sinoviales en cartílago acarrea fibroblastos invasores de cartílago, comportamiento que se correlaciona con la destrucción de articulaciones (Tolboom *et al*., 2005). Se ha acumulado considerable información sobre la destrucción de las articulaciones y el papel de la activación de los osteoclastos como un proceso clave que conduce a la erosión ósea. Esta asociación se ha demostrado, ya que la inhibición específica de la activación de los osteoclastos puede reducir la destrucción de la articulación, aunque no disminuye la inflamación (Cohen *et al*., 2008). No se tiene claro si la artritis comienza como un problema principal en el hueso y posteriormente se traslada a la articulación o viceversa. Un argumento para deducir que la artritis reumatoide se desarrolla a partir de la articulación, es la observación de que

fibroblastos como los sinoviocitos presentan un comportamiento alterado, por lo cual podrían propagarse entre las articulaciones, lo que sugiere que de este modo podría generarse la poliartritis. La regulación de la inflamación inmune depende de equilibrios entre el número y la fuerza de diferentes tipos de células (Lefévre *et al*., 2009).

La sinovitis es el proceso en el cual los leucocitos se infiltran en el compartimento sinovial, formando una acumulación de leucocitos que se refleja principalmente en la migración, en lugar de una proliferación local. La migración celular se habilita por la activación endotelial en la microvasculatura sinovial, lo que aumenta la expresión de moléculas de adhesión (incluyendo integrinas, selectinas, y miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas) y quimiocinas. La sinovitis son en consecuencia por los rasgos característicos de la neoangiogénesis, que es inducida por las condiciones locales de hipoxia y citocinas, así como la linfangiogénesis insuficiente, que limita egreso celular (Szekanecz *et al*., 2010). Estos cambios microambientales, combinados con una reorganización profunda de la arquitectura sinovial y activación de los fibroblastos locales, permite la acumulación de tejido inflamatorio sinovial en la artritis reumatoide (Figura 3) (McInnes y Schett, 2011).

Una cascada inflamatoria clave en la AR, es la que incluye la producción y expresión de TNF (Factor de Necrosis Tumoral, siglas en inglés). Esta vía conduce la inflamación sinovial y destrucción de las articulaciones. La producción de TNF tiene varias causas, incluyendo las interacciones entre linfocitos T y B, fibroblastos sinoviales y los macrófagos. Este proceso conduce a sobre-producción de citocinas, tales como la interleucina 6 (IL-6), que también impulsa la inflamación persistente y destrucción articular. El proceso para la producción de otras citocinas proinflamatorias (por ejemplo, la IL-1) difiere del proceso para la IL-6, en el cual, la producción es menos marcada o específica para uno y/o más subconjuntos de enfermedades. Así como se muestra en la artritis idiopática juvenil o en la enfermedad de Still´s por los efectos del bloqueo de la IL-1 (Choy *et al*., 2002).

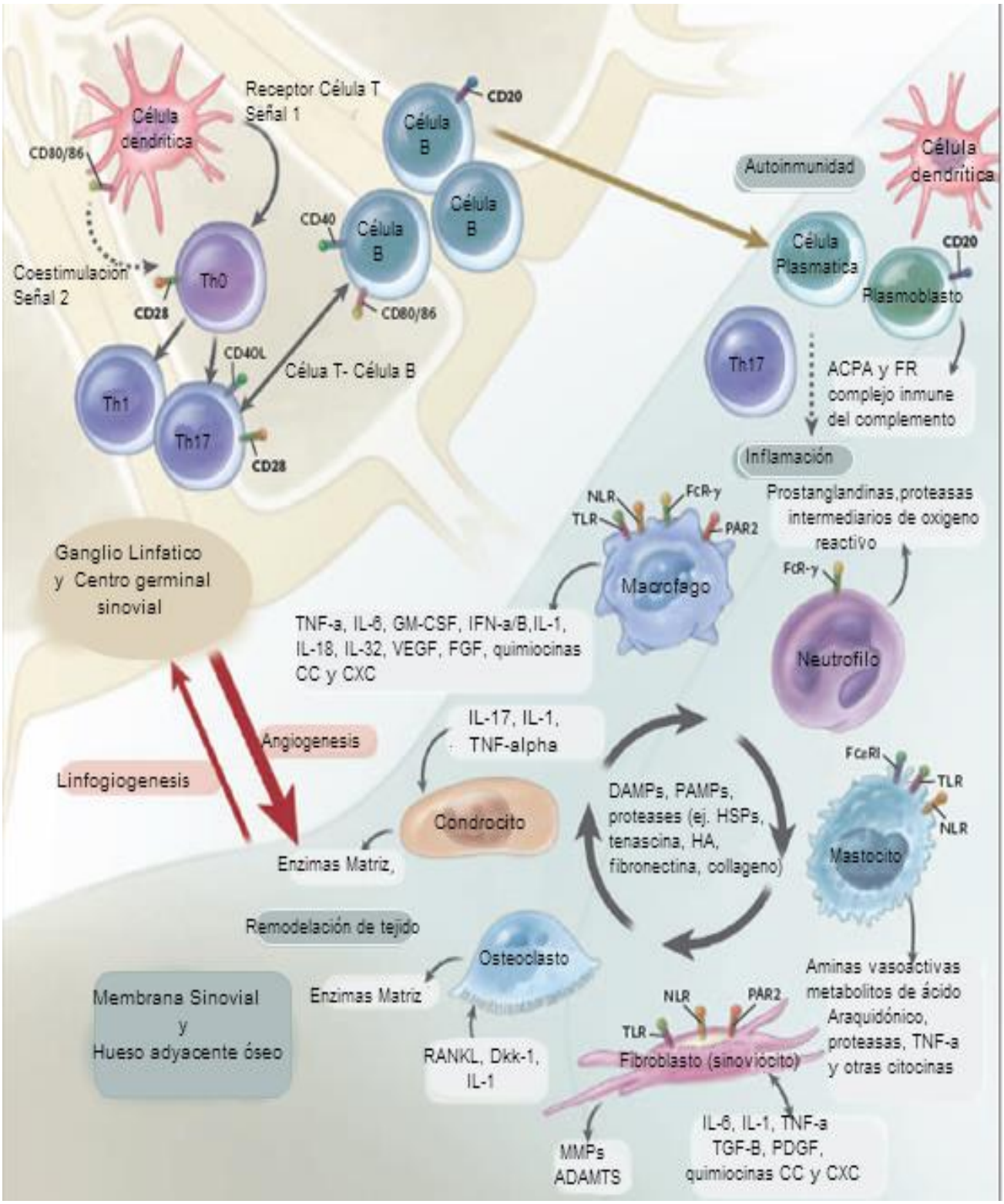

Figura 3. Proceso de Inmunidad Adaptativa e Innata dentro de las articulaciones con Artritis Reumatoide (Modificado de McInnes y Schett, 2011).

2.4.3. Citocinas y Factores de crecimiento

Las citocinas son pequeños péptidos, productos celulares esenciales para la comunicación celular. Dichos péptidos actúan sobre células blanco a través de receptores de alta afinidad, al activarse las células de la serie monocito-macrófago. Las células T (y sus respuestas) son categorizadas como: Th1 (Interferón gamma (INF-γ)) o Th2 (IL-4, IL-13), las primeras implicadas en enfermedades autoinmunes inflamatorias crónicas. La producción de éstas en AR es variable y se correlaciona con el tipo de inflamación en casos de sinovitis con agregados linfoides, donde hay exceso de producción de INF-γ e IL-10, y cuando se desarrolla granuloma se aumenta también el INF-γ e Interleucina 4 (IL-4). En la artritis reumatoide destaca la manera preponderante de la acción patogenética del Factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y de la Interleucina 1 (IL-1), las cuales participan en el proceso inflamatorio articular, destructivo cartilaginoso y desmineralizante óseo, así como de sus manifestaciones sistémicas (Harris, 1993). La célula T se activa de dos maneras en la AR, una dependiente de antígeno y otra totalmente independiente mediada por moléculas co-estimuladoras al existir contactos célula a célula (Moreno, 2003).

La IL-1β es un mediador clave de la enfermedad, debido a que induce la producción de las MMP por los sinoviocitos y condrocitos, contribuyendo al fenómeno resortivo óseo (Fox, 2001). A pesar de tener acciones similares en los tejidos, el efecto de la IL-1 β en la producción local de MMP es más potente que el del TNF-α, pero éste a su vez es más importante en los fenómenos inflamatorios a nivel sistémico, lo cual ha dado pie al concepto que el TNF-α es el responsable de la inflamación articular y la IL-1 ocasiona la destrucción del cartílago y los fenómenos osteopénicos yuxta articulares con la generación de prostaglandinas E. Estas citocinas también pueden ser producidas en menor proporción por los fibroblastos y los neutrófilos, pero la evidencia sugiere que la acción estimulante del linfocito T sobre la serie monocito-macrófago en el tejido sinovial, es más importante que el accionar del linfocito B en la destrucción tisular. La IL-1β y el TNF-α actúan de manera sinérgica y complementaria, estimulan diferentes

receptores y vías de transducción, lo cual permitiría pensar que en el futuro las terapias biológicas combinadas que inhiban ambos factores serían de gran utilidad. Las citocinas perpetúan y amplifican la inflamación en las articulaciones. La IL-1 producida por macrófagos, IL-2 por linfocitos Th1, IL-3 por linfocitos Th2, IL-4 e IFN-γ producidas por el linfocito T, activan y amplifican la respuesta inmune celular y humoral. La IL-1, la IL-6, el factor estimulante de colonia (CSF-1) y TNF-α producidos especialmente por los macrófagos y fibroblastos, inician la respuesta inmune, conllevan a la proliferación celular e incrementan la actividad enzimática degradativa de la matriz mediadas por prostanglandinas, fiebre y resorción ósea (Fox, 2001; Hale y Hanes, 2001).

El TGF-β, actúa contrarrestando los efectos de la IL-1, IL-6 y TNF-α. Suprime la producción de colagenasas por los sinoviocitos, tiene efectos reparativos a nivel articular, aumenta la biosíntesis de proteínas de matriz y tiene acciones inmunosupresoras. Igualmente, se producen también quimiocinas de las cuales se conocen cuatro familias, siendo las más importantes la C-X-C y la C-C, que tienen un poderoso efecto quimioatrayente sobre los tejidos y permiten la migración y residencia de los neutrófilos en la articulación que al activarse generan radicales superóxido, lesivos para el tejido y enzimas lisosomales con propiedades degradativas (Luster, 1998).

Igualmente, se producen citocinas vasoactivas, activación de fibrinólisis y producción de plasmina que activan a su vez otras colagenasas y estromelisina. Últimamente se ha prestado mucha atención a la IL-15 y la IL-18, ya que trabajan reclutando más células T, promoviendo su proliferación y la estimulación de dichas células, para que interactúen con macrófagos sinoviales y se produzca más TNF-α, de tal manera que perpetúan y mantienen el proceso inflamatorio. Ya se han detectado inhibidores naturales de la IL-18, que bloquearían la estimulación permanente de las células Th1. Se ha considerado que las citocinas inmunoreguladoras son el INF-γ, la IL-2, 4, 5, 7, 9, 10 y 11 y las proinflamatorias el TNF-α, la IL-1, la IL-6 y la IL-18. La IL-4 actúa preferencialmente sobre las células B y tiene un efecto inhibitorio en la producción de otras citocinas en los monocitos;

acción similar tiene la IL-10 y la IL-13, las cuales estimulan la expresión del receptor soluble IL-1Rα de la IL-1, e inhiben la producción de MMP. La IL-17, producida por células activadas de memoria CD4, tiene grandes efectos proinflamatorios e induce la producción de IL-1 y TNF-α, además, estimula la producción de MMP, también aumenta la producción de óxido nítrico por el cartílago y estimula la diferenciación osteoclástica. La inhibición de esta citocina es un blanco potencial para el tratamiento de la AR (McInnes y Schett, 2011). La relación de citocinas y su actividad relevante en la enfermedad se describen en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Citocinas clave implicadas en la patogénesis de la artritis reumatoide (McInnes y Schett, 2011).

Citocina	Principales funciones más relevantes de la enfermedad
TNF-α	Activa leucocitos, células endoteliales y fibroblastos sinoviales, que inducen la producción de citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y la enzima de matriz; suprime función de células T reguladoras, activación de osteoclastos, resorción de cartílago y hueso.
IL-1α e IL-1β	Activa leucocitos, células endoteliales y fibroblastos sinoviales, induce la producción de la enzima metaloproteinasas de matriz por los condrocitos, activa osteoclastos, control de fiebre, mejora metabolismo de glucosa.
IL-6	Activa los leucocitos y osteoclastos, involucrado en la diferenciación de linfocitos B, regula metabolismo de lípidos, respuesta de fase aguda y la anemia de enfermedades crónica.
IL-7 y 15	Promueve y mantiene la activación de las células NK, T de memoria, la apoptosis bloque, mantiene interacciones afines células T-macrófagos.
IL-17A e IL-17F	Actúan sinérgicamente para potenciar la activación de los fibroblastos sinoviales, condrocitos y osteoclastos.
IL-18	Promueve la activación de Th1, neutrófilos y células NK.
IL-21	Activa Th17 y subconjuntos de células B.
IL-23	Prolifera Th17.
IL-32	Activa la producción de citocinas por varios leucocitos y promueve la diferenciación de osteoclastos.
IL-33	Activa mastocitos y neutrófilos.

2.5. Receptores Serotoninérgicos en Artritis Reumatoide

La serotonina (5-Hidroxitriptamina, 5-HT) es un neurotransmisor indolamina importante, que además de tener una participación fundamental en procesos fisiológicos del Sistema Nervioso Central, también regula diversas funciones biológicas, mostrando efectos inmunomoduladores. Se han identificado siete grupos principales de receptores 5-HT ($5\text{-}HT_{1\text{-}7}$); todos están acoplados a la proteína G, a excepción del $5\text{-}HT_3$, el cual es un canal iónico dependiente de ligando. Dichos receptores tienen un papel importante en la mediación de procesos fisiológicos tales como la contracción del musculo liso, la agregación plaquetaria, la modulación del estado del ánimo y la percepción. Además, varios linajes de células hematopoyéticas tales como plaquetas, monocitos y linfocitos pueden almacenar y liberar 5-HT cuando son estimuladas (Mossner y Lesch, 1998).

Se ha observado que el RNAm de diversos receptores serotoninérgicos se encuentra expresado no solo por las neuronas, sino también en células dendríticas, monocitos, linfocitos y células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC); entre ellos se encuentran los receptores $5\text{-}HT_{1B}$, $5\text{-}HT_{1F}$, $5\text{-}HT_{2A}$, $5\text{-}HT_{2B}$, $5\text{-}HT_6$ y $5\text{-}HT_7$ (Stefulj *et al*., 2000). Posteriormente, fueron identificados los RNAm de los receptores $5\text{-}HT_{2C}$ y $5\text{-}HT_{5A}$ (Marazziti *et al*., 2001) y la presencia del receptor $5\text{-}HT_{5A}$ en la membrana de linfocitos humanos, por lo cual el receptor podría estar relacionado con la regulación de procesos inmunológicos (Rodríguez-Cruz, 2013).

El receptor $5\text{-}HT_{5A}$ es uno de los menos estudiados; por ello no se tienen agonistas selectivos totales. Sin embargo, en un estudio realizado por Dietz *et al*. (2005), se observó que el ácido valerénico, el cual es un compuesto mayoritario del extracto de *Valeriana officinalis* conocida como valeriana, tiene actividad agonista parcial selectiva sobre el receptor $5\text{-}HT_{5A}$ en un 80% a una concentración de 50 µg/ml ($2x10^{-4}$ M).

Un estudio realizado por Dürk *et al*. (2005) demostró que ciertos receptores tales como el 5-HT_3, 5-HT_4 y 5-HT_7, modulan la expresión de citocinas proinflamatorias, tales como la IL-1β, IL-6 e IL-8/CXCL8, sin tener efecto sobre IL-18 e IFN-γ; dicha modulación de citocinas y procesos inflamatorios pudiera estar mediada a través del control de la secreción de la IL-12 y TNF-α, debido a que éstos son reducidos por los receptores serotoninérgicos (Idzko *et al*., 2004), de forma similar lo observaron Maleki-Dizaji *et al*. (2010) en la modulación de la producción de TNF-α/PGE_2 en leucocitos por acción de Granisetron, antagonista del receptor 5-HT_3. El receptor 5-HT_7 se ha determinado como un blanco farmacológico para suprimir la inflamación de diversos procesos tal como lo mostraron Albayrak *et al*. y Kim *et al*. (2013), observándose su relación en el proceso inflamatorio, debido a que modula la expresión de interleucinas proinflamatorias (al inhibir dicho receptor se interrumpe el proceso inflamatorio).

Por otro lado, se ha demostrado que el receptor 5-HT_{2A} está directamente implicado en los procesos inflamatorios pero con un efecto supresor, debido a que puede disminuir la expresión de diversos marcadores proinflamatorios, tales como IL-4, IL-10 e inclusive TNF-α (Akiyoshi *et al*., 2006). La acción del receptor 5-HT_{2A} sobre TNF-α, está implicada en la activación del receptor para inhibir la producción de TNF-α e inhibir el proceso inflamatorio, que pone de manifiesto que no todos los receptores serotoninérgicos precisamente se comportarían de la misma manera en la expresión de citocinas proinflamatorias (Yu *et al*., 2008). En la artritis reumatoide se ha visto que la densidad del receptor 5-HT_{2A} decrece sus niveles en plaquetas, dicho proceso se debe a que los receptores estén regulando la expresión de las citocinas proinflamatorias y el TNF-α para reducir la inflamación de la patología (Kling *et al*., 2006).

Debido a la implicación del sistema serotoninérgico con la acción de células blancas y la expresión de citocinas dependientes de la activación o inhibición de receptores a serotonina, dicha familia de receptores tienen gran importancia en la

regulación de procesos del sistema inmune y la acción celular, siendo de este modo particularmente clave en enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide.

2.6. Manifestaciones Clínicas

El dolor, consecuencia de la inflamación presentada en las articulaciones, es el síntoma más frecuente de la artritis reumatoide. Las articulaciones dañadas con más frecuencia son las muñecas, los nudillos, las articulaciones de los dedos, los codos, los hombros, las caderas, las rodillas y los tobillos. La inflamación, mantenida y no controlada, termina por dañar los huesos, ligamentos y tendones que hay alrededor, lo cual conduce a la deformidad progresiva de las articulaciones y a la pérdida de la capacidad para realizar algunas tareas de la vida cotidiana.

La enfermedad comienza con dolor e hinchazón en las pequeñas articulaciones de los dedos de las manos con rigidez o tirantez matutina que puede presentarse hasta por varias horas. Es característico que las molestias se alivien con el movimiento y a lo largo del día. Sin embargo, los síntomas evolucionan en semanas o meses desencadenando una poliartritis simétrica, especialmente a medida que avanza y favorece las articulaciones interfalángicas de las manos y los pies, tales como la interfalángica proximal, articulaciones metacarpofalángicas y metatarsofalángicas, así como la muñeca y el tobillo. Otros hallazgos comunes incluyen engrosamiento sinovial, derrame, eritema, disminución de la amplitud de movimiento, anquilosamiento y subluxación. Dentro de las quejas sistémicas se presenta fatiga, malestar general, fiebre, pérdida de peso y depresión. Además, las manifestaciones extra-articulares más comunes incluyen pericarditis, pleuritis, neuropatía, escleritis, glomerulonefritis, fenómeno de Raynaud, enfermedad pulmonar intersticial, anemia, leucocitosis, trombocitopenia, linfadenopatía y esplenomegalia. En la Figura 4 se expone la frecuencia aproximada con la que se afectan las diferentes articulaciones (Naranjo, 2006).

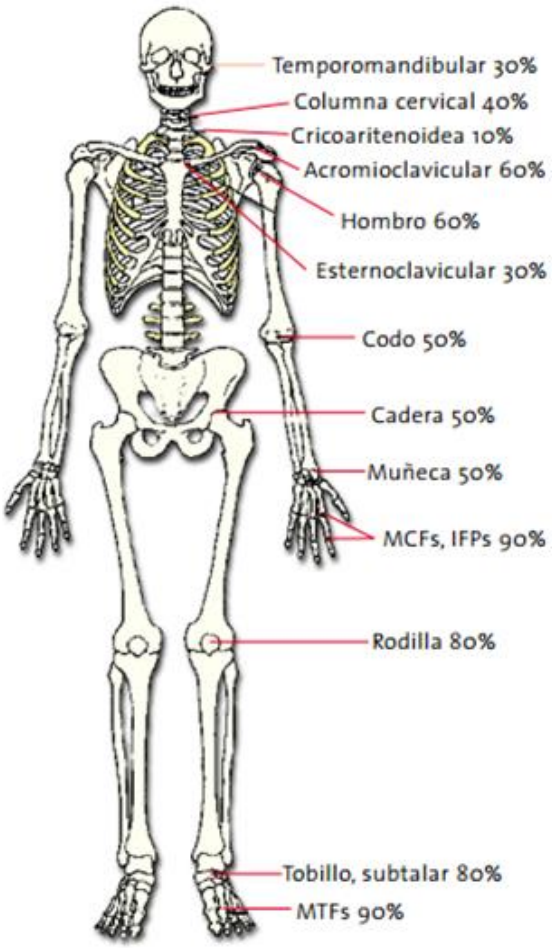

Figura 4. Prevalencia de articulaciones afectadas en la artritis reumatoide (Naranjo, 2006).

2.7. Epidemiología e Incidencia

Varios estudios de incidencia y prevalencia de la AR han sido reportados en las últimas décadas, lo que sugiere una variación considerable de la incidencia de la enfermedad entre las diferentes poblaciones. Sin embargo, los estudios publicados sobre la epidemiología AR presentan diferencias metodológicas. Estas diferencias incluyen los métodos de identificación de criterios, así como el tipo de incidencia y las tasas de prevalencia, debido a que los criterios del ACR difieren de los criterios de la EULAR del 2010, al excluir algunos casos como procesos de artritis temprana. Los estudios anteriores pueden haber incluido casos que no corresponden a la definición actual de la AR. Además, los métodos de

determinación de los casos difieren entre los estudios. Éstas y otras diferencias metodológicas ponen algunas limitaciones en la comparación de los estudios descriptivos y la interpretación de los diferentes hallazgos. Sin embargo, es probable que la epidemiología de la AR presente algunas tendencias características, que podrían considerarse como independientes de las cuestiones metodológicas (Alamanos y Drosos, 2005).

2.7.1. Prevalencia de la Artritis Reumatoide

La mayoría de los estudios de prevalencia llevados a cabo en las zonas de América del Norte y Europa del Norte estiman una prevalencia de 0.5 a 1.1 % (Gabriel *et al*., 1999; Simonsson *et al*., 1999; Power *et al*., 1999; Riise *et al*., 2001; Carmona *et al*., 2002; Symmons *et al*., 2002; Andrianakos *et al*., 2003). En México, para el año 2011, se ha reportado que al menos 1 millón 700 mil mexicanos padecen la enfermedad, lo cual representa en promedio 1.6% de la población total. El estado con mayor prevalencia es el de Yucatán con 2.8%, contrario a esto, estados como Nuevo León y el Distrito Federal son los que presentan menor prevalencia con 0.7% y 1% respectivamente (Peláez-Ballestas *et al*., 2011). Por su parte, en el estado de Querétaro se encuentra reportada una prevalencia de 0.8% de los pacientes con tratamiento para AR (Santibáñez-Beltrán *et al*., 2013). Los estudios realizados en los países del sur de Europa reportan una prevalencia de 0,3 a 0,7 % (Carmona *et al*., 2002; Andrianakos *et al*., 2003).

Los estudios realizados en los países en desarrollo también reportan una prevalencia relativamente baja de la enfermedad (entre 0,1 % y 0,5 %) (Spindler *et al*., 2002; Dai *et al*., 2003; Akar *et al*., 2004; Senna *et al*., 2004). La mayor prevalencia se ha reportado en algunos nativos americanos de 5.3 a 6.0%, y una muy baja frecuencia de la AR en algunas zonas del África rural que van desde 0.3 a 0.9 % (Silman *et al*., 1993). Las tasas anuales de incidencia de la AR varían entre 20 y 50 casos por cada 100.000 habitantes en América del Norte y los países del norte de Europa. Hay muy pocos estudios de los países del sur de

Europa que indican una incidencia relativamente baja de la enfermedad (Guillemin *et al*., 1994; Andrianakos *et al*., 2003).

Estudios previos realizados en Japón sugieren que existe una mayor incidencia de la enfermedad, entre 4 a 9 casos por cada 100 personas, pero todos ellos se basan en los criterios de identificación anteriores (Shichikawa *et al*., 1999). El Cuadro 3 resume los datos sobre la prevalencia e incidencia de la AR en diferentes regiones del mundo y en varios países.

2.7.2. Tendencia temporal en incidencia y prevalencia de Artritis Reumatoide

Existen datos relativamente limitados sobre las tendencias de la incidencia y la prevalencia de la AR a través del tiempo. Algunos estudios de América del Norte, Europa del Norte y de las poblaciones japonesas sugieren una disminución en la prevalencia e incidencia de la enfermedad después de la década de 1960. Sin embargo, esta disminución en la tendencia podría estar relacionada con el sistema metodológico utilizado en los estudios epidemiológicos, el cual podría estar reportando una menor prevalencia de la que realmente existe. Las diferencias en la determinación de los casos, la identificación de casos y el acceso a servicios de salud podría explicar en cierta parte el descenso observado (Doran *et al*., 2002; Shichikawa *et al*., 1999).

Cuadro 3. Tasas de Prevalencia e Incidencia de artritis reumatoide en todo el mundo (casos por cada 100 habitantes) (Alamanos y Drosos, 2005).

Población		Tasa de Prevalencia	Tasa de Incidencia
Norte América	USA (población general)	0.9-1.1	0.2-0.07
	USA (nativos-americanos)	5.3-6.0	0.09-0.89
	México	1.6	
Norte Europa	Inglaterra	0.8-1.1	0.02-0.04
	Finlandia	0.8	0.03-0.04
	Suecia	0.5-0.9	
	Noruega	0.4-0.5	0.02-0.03
	Holanda	0.9	0.05
	Dinamarca	0.9	
	Irlanda	0.5	
Sur Europa	España	0.5	

	Francia	0.6	0.01
	Italia	0.3	
	Grecia	0.3-0.7	0.02
	Yugoslavia	0.2	
Sur América	Argentina	0.2	
	Brasil	0.5	
	Colombia	0.1	
Asia	Japón	0.3	0.04-0.09
	China	0.2-0.3	
	Indonesia	0.2-0.3	
	Pakistán	0.1	
Medio Oriente	Egipto	0.2	
	Israel	0.3	
	Turquía	0.5	
África		0-0.3	

2.7.3. Mortalidad y Supervivencia

Las tasas de mortalidad son más altas entre los pacientes con AR que en la población general, aunque las tasas de mortalidad reportadas varían ampliamente entre los estudios realizados. La supervivencia esperada de los pacientes con AR es probable que disminuya 3 a 10 años de acuerdo con la gravedad de la enfermedad, la edad de aparición de la enfermedad, el tratamiento suministrado, así como los factores genéticos y ambientales. Las causas de muerte no difieren significativamente entre los pacientes con AR y la población en general. La mayoría de los individuos afectados fallecen de las mismas causas que la población en general, pero a una edad más joven (Wolfe *et al*., 1994; Gabriel *et al*., 2003).

2.8. Diagnóstico

Los primeros criterios de clasificación fueron diseñados para distinguir la artritis reumatoide establecida a partir de otros tipos de enfermedades de articulaciones. Los criterios del ACR están limitados por la falta de sensibilidad y especificidad para la clasificación de los pacientes con AR, debido a que, en los criterios es difícil que se pueda incluir la identificación de personas con artritis muy temprana,

que posteriormente presentarán AR (Banal *et al*., 2009). El tratamiento eficaz de la artritis temprana evita o retrasa los síntomas de los pacientes que cumplen con los criterios de 1987. Además, dos síntomas, el daño articular-erosivo y enfermedades extra-articulares, son cambios generados de última hora por el tratamiento moderno, que impiden el diagnóstico (Morvan *et al*., 2009). Los modelos de predicción se han desarrollado a partir de estudios observacionales prospectivos de pacientes tratados con artritis temprana. Estos modelos están diseñados para pronosticar los resultados en las personas con artritis temprana que no cumplen actualmente los criterios de 1987 (Figura 5) (Kuriya *et al*., 2009).

En la presencia de artritis reumatoide, la inflamación sistémica se muestra por los altos reactantes de fase aguda y la rigidez matutina prolongada, factores que aumentan particularmente en la AR. Esto ha llevado a que la ACR y la EULAR elaboren nuevos criterios de clasificación para artritis temprana (Figura 5) (Aletaha *et al*., 2010). Estos criterios se desarrollaron en tres fases. La primera fase fue un enfoque basado en datos, sobre la base de cohortes de pacientes con artritis temprana, para identificar factores reactantes en suero y sus niveles, asociados con la decisión de un médico para iniciar tratamiento con metotrexato. La segunda fase fue un enfoque basado en el consenso para refinar estos factores con una serie de evaluaciones escritas de los pacientes (es decir, resúmenes escritos de casos anónimos que proporcionaron información suficiente para tomar decisiones sobre el paciente) para permitir la entrada de pensamiento clínico actual. La tercera fase ha resumido toda la información para llegar a un modelo de predicción y corte para la puntuación de probabilidad (Aletaha *et al*., 2010).

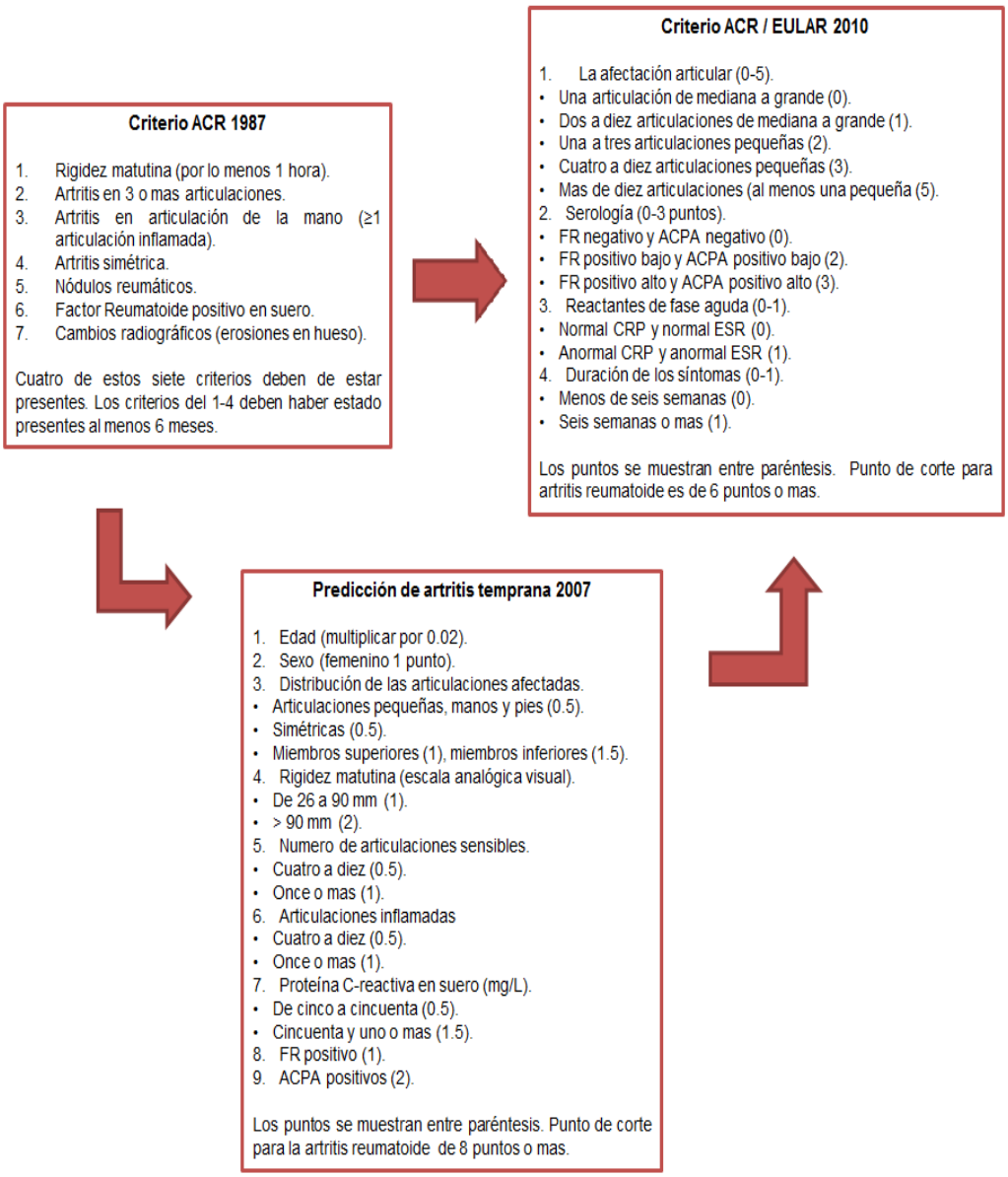

Figura 5. Clasificación convencional y nueva de criterios para artritis reumatoide (Modificado de Scott *et al*., 2010).

2.9. Terapias

El tratamiento del paciente con AR está dirigido para preservar la integridad y la función de la articulación, así como la prevención de manifestaciones extra articulares. Todas las articulaciones afectadas pueden llegar a ser destruidas, por lo tanto, todos los pacientes con la enfermedad establecida deben recibir

tratamiento tan pronto como sea posible. El tratamiento de los pacientes con AR se realiza con fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDS, por sus siglas en inglés) y terapias anticitocinas. Mientras que el tratamiento de la AR ha evolucionado a partir de la medicina empírica (uso de sales de oro inyectadas) a las terapias basadas en la experimentación preclínica sustancial (terapias del factor de necrosis tumoral alfa), la selección de un agente terapéutico o de una combinación de productos farmacéuticos para un paciente individual, es impulsada principalmente por la gravedad de la enfermedad, las características del paciente y los costos. Los tratamientos con los que actualmente se cuenta van dirigidos principalmente a resolver los signos y síntomas, restaurar la función física y prevenir el desarrollo de daño en las articulaciones, o en caso de que exista daño, para aminorar o detener la progresión de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de la disponibilidad actual de una amplia gama de fármacos y agentes biológicos (utilizados ya sea individualmente o en combinación), puede que no sea posible lograr una remisión completa. La terapia farmacológica es el pilar terapéutico para todos los pacientes, excepto aquéllos en remisión. Los medicamentos que se usan ya sea solos o en combinación (Cuadro 4), son los antinflamatorios no esteroideos (AINEs), DMARDS y terapias biológicas (Paula y Alves, 2014).

Las combinaciones de agentes de las diferentes clases de terapias se emplean con frecuencia en el tratamiento. Sin embargo, el uso simultáneo de dos o más agentes de una clase de drogas se suele reservar para los DMARDS. Varias combinaciones de DMARDS se han utilizado para tratar tanto los principios de la AR y la enfermedad establecida. Actualmente, no está claro qué combinación es la mejor, en qué momento deberían utilizarse, o quienes tienen más probabilidades de beneficiarse de la terapia de combinación frente a monoterapia de DMARD (Khurana y Berney, 2005; Paula y Alves, 2014).

Cuadro 4. Medicamentos para el tratamiento de artritis reumatoide (Khurana y Berney, 2005; Paula y Alves, 2014).

Analgésicos/AINES	DMARDS	Biológicos/Anticitocinas
Acetaminofeno	**Azatioprina**	**Etanercept**
Tramadol	**D-penicilamina**	**Infliximab**
Inhibidores COX2	**Hidroxicloroquina**	**Adalimumab**
Capsaicina	**Metotrexato**	**Anakinra**
Narcóticos	**Sulfasalazina**	**Rituximab**
Ibuprofeno	**Leflunomida**	**Abatacept**
		Tocilizumab

Los fármacos antirreumáticos son sustancias potencialmente tóxicas, por lo tanto, debe alcanzarse un equilibrio entre los efectos secundarios y el efecto terapéutico. Por ello, todos los DMARDS tienen recomendaciones de vigilancia de sus efectos secundarios. La estrategia recomendada por el ACR para la vigilancia de los medicamentos en el tratamiento de la AR con DMARDS, es comprobar los niveles de transaminasas en suero, albúmina y creatinina en sangre, proceso que se realiza cada 4 a 8 semanas. Sin embargo, si la leflunomida y el metotrexato se usan en conjunto, la supervisión debe realizarse de manera mensual. El tratamiento de las manifestaciones extra-articulares de la artritis reumatoide, tales como la enfermedad intersticial pulmonar y vasculitis, entre otras, se basa en una evaluación de la gravedad y la actividad de dichos síntomas, llevando a cabo un monitoreo constante. La mayor parte de las condiciones que amenazan la vida son tratadas con DMARDS, esteroides a dosis altas y/o inmunosupresores. Las decisiones de gestión requieren distinguir entre la infección que subyace a la AR y los efectos secundarios de los medicamentos. El tratamiento antirreumático riguroso no logra curar la enfermedad, ya que tiene como objetivo suprimir la actividad de la enfermedad al máximo, por lo cual solo reducirá la enfermedad y

sus complicaciones extra-articulares, notando una mejoría con buen control del dolor y la inflamación de las articulaciones, lo que es importante, con una buena función física y calidad de vida. Cuando se destruyen las articulaciones, los pacientes deben ser derivados al cirujano ortopédico, para realizar una reconstrucción o reemplazo de la misma (Khurana y Berney, 2005).

La utilización de nuevas terapias dirigidas a diversos factores del proceso inflamatorio, ha ido proponiendo el desarrollo de anticuerpos, anticitocinas y antiquimiocinas que bloquen sus señales proinflamatorias. El Etanercept es una de estas nuevas terapias, presentándose como un anticuerpo humanizado el cual tiene como objetivo el bloqueo del TNF-α y de su receptor, con ello se evita la expresión de citocinas proinflamtorias.

El Rituximab, un anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD20, fue utilizado originalmente en el linfoma no Hodgkin; su acción consiste en la inducción de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, la citotoxicidad dependiente del complemento, y la apoptosis de los linfocitos B en diversas etapas de desarrollo, lo cual conduce a una disminución transitoria casi completa en la sangre periférica, aunque sólo parcialmente en la médula ósea y nichos de tejido sinovial. El beneficio se refleja en una reducción de la actividad de la enfermedad clínica y los marcadores de inflamación de laboratorio, deteniendo la progresión radiográfica, mejorando la capacidad funcional. El efecto dura consistentemente más de 6 meses después de un solo curso de dos administraciones de la droga, separadas por 15 días.

La administración de Abatacept conduce a la inactivación de linfocitos B con impedimentos y la reducción de los niveles de autoanticuerpos, junto con una reducción en la activación de los osteoclastos mediados por la disminución de la liberación de citocinas de los linfocitos T, linfocitos B, y macrófagos. El Abatacept es más eficaz en pacientes con ACPA positivo. La razón de esto es desconocida, debido a que la AR es un síndrome con múltiples subtipos que pueden responder de manera diferente a distintas terapias.

El bloqueo de la señalización de IL-6 mediante la administración de Tocilizumab ha producido resultados consistentes, ya sea en combinación con metotrexato o en monoterapia. Los ensayos de fase III ya se han realizado con una formulación oral disponible de Tofacitinib, que ha demostrado ser exitoso en la reducción de la actividad clínica y la enfermedad de laboratorio, y la progresión radiográfica en comparación con el placebo, con un buen perfil de seguridad. La Anakinra, inhibidor de la IL-1, es una forma no glicosilada recombinante del antagonista del receptor de IL-1 humana (Paula y Alves, 2014).

En el caso de los sistemas serotoninérgicos, se han utilizado terapias sobre la recaptura de serotonina, las cuales consisten en la utilización de fluoxetina y citalopram como inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (SSRI´s, por sus siglas en inglés). Con ello, los niveles de serotonina circulante se elevan, teniendo un efecto de disminución en la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF-α e IL-6, así como la inhibición de los receptores tipo Toll. Sin embargo, la disminución del proceso inflamatorio es debido a la acción de la fluoxetina y citalopram como SSRI´s, que ayudan al aumento en la concentración de serotonina, la cual posiblemente actúe sobre sus receptores para la disminución de las citocinas proinflamatorios, mecanismos que no son claros (Sacre *et al*., 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

La adaptación continua del sistema inmune frente a los tratamientos biológicos para la artritis reumatoide, ha obligado a la búsqueda de nuevas terapias para el control de este padecimiento; uno de los controles más importantes es el de las citocinas proinflamatorias, debido a que son los responsables de la mayor afectación de la patología y de la inflamación del tejido sinovial.

Se sabe que los receptores serotoninérgicos tienen un efecto sobre la expresión de las citocinas proinflamatorias, entre ellos 5-HT_3, 5-HT_4 y 5-HT_7, los cuales tienen un efecto activador sobre la expresión de dichas citocinas; la activación de esos

receptores ocurre a través de su acoplamiento a una proteína G_s. El receptor 5-HT_{5A}, al estar acoplado a proteína G_i y al activarse por acción del agonista parcial ácido valerénico, se esperaría que tuviese un efecto en la disminución de la expresión de las citocinas proinflamatorias, con lo que disminuiría el proceso inflamatorio de la membrana sinovial en la artritis reumatoide y controlaría su sintomatología. Con esto se busca que este receptor sea utilizado como nuevo blanco farmacológico para el tratamiento de la inflamación en la artritis reumatoide.

4. HIPÓTESIS

La activación del receptor serotoninérgico 5-HT_{5A} disminuirá las citocinas proinflamatorias, así como del factor TNF-α en muestras de pacientes con artritis reumatoide.

5. OBJETIVOS

5.1. General

- Evaluar los efectos de la actividad del receptor 5-HT_{5A} en la expresión de citocinas proinflamatorias en muestras de linfocitos de pacientes con artritis reumatoide.

5.2. Específicos

- Evaluar la expresión del receptor 5-HT_{5A} en linfocitos de pacientes con artritis reumatoide en comparación con un control de sujetos sanos.
- Cuantificar IL-1 e IL-6 en medio de cultivo de linfocitos de pacientes con artritis reumatoide, con y sin activador del receptor 5-HT_{5A} y comparar con un control de sujetos sanos.
- Cuantificar TNF-α en medio de cultivo de linfocitos de pacientes con artritis reumatoide, con y sin activador del receptor 5-HT_{5A} y comparar con un control de sujetos sanos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Equipos

Campana de flujo laminar

Centrífuga

Microcentrífuga

Espectrofotómetro

Equipo ELISA de Bio Rad

Cámara de Electroforesis Vertical

Fuente de Poder

Hypercassette

Lámpara Kodak ajustable modelo B

6.2. Materiales y Reactivos

Tubos para muestra sanguínea con EDTA

Kit Ficoll-Paque de General Electric Healthcare Bio Science

Tubos Eppendorf

Tubos Falcon

Medio RPMI 1640

Suero fetal bovino

Solución de suplemento Penicilina-Estreptomicina-L-glutamina 100x

Mechero Bunsen

TRIS-HCl

Solución acida de azul brillante de Coomasie

Gel de poliacrilamida

Solución PBS 1X

Solución PBT 0.5 %

Anticuerpo 5-HT_{5A} hecho en conejo

Anticuerpo HRP hecho en cabra anticonejo

Kit ECL Amersham de General Electric Healthcare

Placas fotográficas hipersensibles para revelado Amersham de General Electric
Estándar de 5-HT_{5A}
Kit ELISA para IL-1, IL-6 y para TNF-α
Fijador Kodak
Revelador Kodak

6.3. Material Biológico

Se utilizaron muestras de sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide (criterio de inclusión ACR-EULAR 2010); además se tomaron muestras de pacientes que no presentaran procesos infecciosos, esto con el fin de eliminar la posibilidad de procesos inflamatorios provocados por infección; se dividieron en dos grupos: pacientes con tratamiento antiinflamatorio (AINE) y pacientes sin tratamiento.

La toma de muestra se realizó bajo las medidas de bioética, de pacientes con Artritis Reumatoide de pobladores de un municipio de Guanajuato, México. Antes de realizar la toma de muestra se le informó al paciente sobre el procedimiento, así como el motivo de la investigación de manera oral y escrita. El paciente debió estar de acuerdo en la realización de la investigación con su muestra sanguínea firmando el consentimiento informado (ANEXO I) para su toma de muestra y manejo de datos de manera confidencial. Posteriormente, se le proporcionó un formulario que llenó, sobre los criterios de inclusión de la ACR-EULAR 2010, dejando en blanco el apartado de los resultados de las pruebas serológicas para artritis reumatoide, los cuales les fueron entregados en plazo de un mes a través de su médico mediante un folio (esto para mantener la confidencialidad de los datos); estos resultados no tuvieron ningún costo para el paciente (ANEXO II). Posteriormente, los estudios se desarrollaron en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México.

Las muestras se procesaron con la técnica Ficoll-Paque de General Electric Healthcare Bio Science para la obtención de linfocitos. Las muestras de linfocitos se separaron en alícuotas de 500 µl y se almacenaron en tubos Eppendorf a 4 °C hasta su utilización en cultivo celular y a -80 ºC para su utilización en la extracción de proteínas para la realización del *Western Blot* para verificar la expresión del receptor a serotonina 5-HT_{5A}.

6.4. Cultivo Celular

Después de haber realizado la toma de muestras con tubos desechables estériles de 5 ml, se procesaron en la campana de flujo laminar, que debió limpiarse previamente con alcohol al 70 %, manteniéndola con luz ultravioleta media hora antes de manejar la muestra. Utilizando cajas de cultivo de 6 pozos se vertieron 2 ml de medio RPMI 1640 en cada muestra, el medio se enriqueció con suero fetal bovino 10 %, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina y fitohemaglutinina a una concentración de 0.02 ml por ml de medio. Se incubaron a 37 ºC en la estufa, la cual estuvo a temperatura constante, con una atmosfera al 95 % de oxígeno y 5 % de CO_2. Se incubaron durante 48 h y posteriormente se les adicionó el tratamiento utilizando las siguientes concentraciones de los compuestos: $1x10^{-12}$ a $1x10^{-3}$ de serotonina y $1x10^{-8}$ a $1x10^{-3}$ de ácido valerénico. Posteriormente se dejaron pasar 24 h y al finalizar este tiempo se llevó a cabo el ensayo de viabilidad celular con azul tripano. Los linfocitos fueron colectados en tubos Eppendorf y almacenados a -80 ºC para su utilización en la extracción de proteínas para la realización del *Western Blot*. De la misma forma, los medios de cultivo de los pozos fueron colectados y almacenados a -80ºC para posteriormente llevar a cabo la cuantificación de los niveles de citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6 y TNF-α.

6.5. Extracción de Proteínas

Una vez que se obtuvieron las muestras de linfocitos de los pacientes, controles sanos y de los cultivos, se almacenaron a -80 ºC; posteriormente se les agregaron 5 mL de amortiguador de extracción (50 mM Tris-HCl pH 9.0-9.5) por cada 5 a 10 $x10^6$ células.

La homogenización se llevó a cabo utilizando el equipo ultraturrax durante 30 segundos en posición '1' en presencia de inhibidores de proteasas. La extracción se completó durante una hora a 4 ºC, con agitación constante (en hielo). Concluida la hora, se centrifugó durante 15 minutos a 3,000 rpm con una microcentrífuga; se recogió el sobrenadante y éste se volvió a centrifugar durante 15 minutos a 12,000 rpm; se tomó nuevamente el sobrenadante, el cual se guardó en alícuotas de 200 µl hasta su utilización en la cuantificación de proteínas.

6.6. Cuantificación de Proteínas

Después de obtener los homogenizados de linfocitos, se realizó una cuantificación de proteína total contenida en cada una de las muestras, utilizando el ensayo para proteínas de Bio-Rad basado en el método de Bradford.

Se prepararon 5 diluciones por triplicado de una proteína estándar (Albúmina Sérica Bovina (BSA) 0.1 µg/mL) a partir de la cual se elaboró la curva de calibración; las diluciones que se elaboraron se muestran en el Cuadro 5 (el rango lineal para BSA fue 1.2 a 20 µg/mL). El colorante que se empleó es una solución ácida de azul brillante de Coomassie.

Se cuantificaron las proteínas de las muestras, midiendo 800 µL de cada muestra a los cuales se agregaron 200 µL de colorante. La cuantificación se realizó en ensayos por triplicado y la muestra se diluyó a 1:10, solo en el caso necesario. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos y su absorbencia fue leída a 595 nm.

Con las absorbencias obtenidas y haciendo uso de la curva de calibración, se obtuvieron las concentraciones de las proteínas de las muestras.

Cuadro 5. Diluciones para la preparación de la curva de calibración de cuantificación de proteínas.

TUBOS (por triplicado)	BSA (µg/mL)	Volumen BSA (0.1 mg/mL) a utilizar	H_2O (µL)	Reactivo de Bradford Bio-Rad (µL)
Blanco	0	0	800	200
1	2.5	25	775	200
2	5	50	750	200
3	10	100	700	200
4	20	200	600	200

6.7. *Western Blot*

Se realizó un análisis de la expresión proteica del receptor 5-HT_{5A} en las muestras de pacientes con artritis reumatoide y de los cultivos con sus tratamientos, se utilizaron como control muestras de individuos sanos.

6.7.1. SDS-PAGE

Se llevó a cabo la separación de proteínas de concentraciones conocidas de las muestras, mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Se calculó el volumen necesario para tener 75 µg de proteína en cada pozo; este volumen se completó con el amortiguador de la muestra para tener un máximo de 20 µL por pozo (en peines de 10 pozos de 1 mm de grosor). Posteriormente, las muestras se hirvieron durante 5 minutos.

Se trabajó con geles de poliacrilamida al 10 % en condiciones reductoras. Se utilizaron peines de 10 pozos en los cuales se colocaron las muestras (30 µL) y los marcadores de peso molecular (10 µL) dispuestos en los pozos de cada extremo. Las muestras se corrieron con un voltaje constante de 100 V los primeros 15 minutos y 150 V durante el tiempo necesario para que la muestra llegue hasta el final del gel (aproximadamente 40 minutos).

6.7.2. Electrotransferencia de Proteínas

Una vez que se separaron las proteínas en función de su diferente peso molecular, se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa. Se les aplicó un campo eléctrico de 200 mA durante una hora; de esta manera las proteínas migraron fuera del gel de poliacrilamida hasta la superficie de la membrana donde se quedaron fuertemente adheridas; de esta manera, el patrón de proteínas que se tenía en el gel de poliacrilamida no cambió al ser transferido hacia la membrana.

Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 minutos en PBS 1X para retirar los restos de poliacrilamida; después se bloqueó la membrana para evitar la unión inespecífica a la superficie de los anticuerpos utilizados para la detección de la proteína de interés. La membrana se incubó durante una hora en leche (Bio-Rad) al 3 % en PBT 0.5 %. Después de bloquear la membrana, se realizaron otros tres lavados en PBS 1X.

Se prosiguió, incubando la membrana toda la noche con el anticuerpo primario anti-5-HT_{5A} (Santa Cruz Biotechnology), hecho en conejo, diluido 1:500 en leche preparada al 1 % en PBT preparado al 0.5 %. Transcurrido ese tiempo, se hicieron tres lavados en PBS 1X; posteriormente, se dejó incubando la membrana con el anticuerpo secundario anti-conejo HRP (Peroxidasa de Rábano Picante, por sus siglas en inglés) (Santa Cruz Biothecnology) durante dos h. Enseguida, se realizaron tres lavados más en PBS 1X para proceder al revelado con

quimioluminiscencia. Como control de carga (proteína de referencia) del ensayo de *Western Blot;* se utilizó anticuerpo anti-actina (Santa Cruz Biotechnology).

6.7.3. Ensayo con Quimioluminiscencia

El ensayo con quimioluminiscencia (ECL) se realizó en un cuarto totalmente oscuro. Se prepararon las siguientes diluciones: 35 mL de fijador Kodak en 160 mL H_2O destilada y 35 mL de revelador Kodak en 160 mL de H_2O destilada.

Se midieron volúmenes iguales (10 mL de c/u) de las soluciones A y B para la preparación del sustrato para quimioluminiscencia ECL, preparado de manera casera por el grupo de investigación del laboratorio (Rodríguez-Cruz, 2013); se mezclaron las soluciones y las membranas se sumergieron durante 1 minuto en dicha mezcla. Se utilizaron placas fotográficas hipersensibles para revelado Amersham General Electric y la lámpara de luz roja Kodak de seguridad ajustable modelo B.

La membrana de nitrocelulosa se presionó contra la placa de revelado en el “hypercassette” durante 1 minuto. Luego, la placa fotográfica se sumergió en el revelador; enseguida se realizó un lavado en agua destilada, después se sumergió en el fijador y por último se enjuagó con agua destilada por un minuto en cada solución. Se obtuvo como resultado las placas con patrones de bandeo. Estas bandas fueron evaluadas por medio de un análisis densitométrico con el software Quantity One de Bio-Rad.

6.8. Cuantificación de IL-1, IL-6 y TNF-α

Se llevó a cabo la cuantificación de los niveles de proteína IL-1, IL-6 y TNF-α mediante la técnica de ELISA de PEPROTECH, en las muestras de pacientes con artritis reumatoide sin el tratamiento de ácido valerénico, agonista parcial del receptor 5-HT_{5A} y en las muestras en las cuales se suministró el agonista parcial

del 5-HT_{5A} para observar el efecto y la relación que tiene dicho receptor serotoninérgico con la expresión de las citocinas proinflamatorias y el factor TNF-α. Se utilizaron muestras de linfocitos de individuos sanos como control.

6.8.1. Cuantificación de IL-1

Se utilizó el kit Mini ELISA IL-1α (900-M11) de Peprotech. Para la preparación de la placa, se diluyó el anticuerpo de captura con PBS hasta una concentración de 0.5 µg/ml. Inmediatamente, se adicionaron 100 µl a la placa de ELISA. Se cubrió la placa y se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Después se removió el líquido y realizó 4 lavados con 300 µl de buffer de lavado por pozo. Después de lavar la placa, se invirtió para remover el residuo sobre una toalla de papel, se agregaron 300 µl de buffer de bloqueo por cada pozo. Se incubó durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se aspiró y lavó 4 veces la placa. Posteriormente, el estándar se llevó a dilución desde 1 ng/ml hasta el cero, inmediatamente se agregaron 100 µl de estándar o muestra por pozo por triplicado, y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Para llevar a cabo la detección se aspiró el líquido y se realizaron 4 lavados, se agregaron 100 µl por pozo del anticuerpo de detección a una concentración de 0.5 µg/ml y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h; terminando la incubación se aspiró el líquido y se realizaron 4 lavados, se agregaron por pozo 100 µl de Avidina-HRP conjugado a una dilución de 1:2000, para incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se aspiró el líquido, se realizaron 4 lavados y se agregaron 100 µl de solución ABTS por pozo; se incubó a temperatura ambiente para el desarrollo del color y finalmente se analizó la placa de ELISA a 405 nm fijando una corrección de la longitud de onda a 650 nm.

6.8.2. Cuantificación de IL-6

Para la cuantificación de IL-6 se utilizó el kit Mini ELISA IL-6 (900-M16) de Peprotech. Para la preparación de la placa, se diluyó el anticuerpo de captura con

PBS hasta una concentración de 1 µg/ml. Inmediatamente, se adicionaron 100 µl a la placa de ELISA. Se cubrió la placa y se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Después se removió el líquido y realizaron 4 lavados con 300 µl de buffer de lavado por pozo. Posteriormente, se invirtió para remover el residuo sobre una toalla de papel, se agregaron 300 µl de buffer de bloqueo por cada pozo. Se incubó durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se aspiró y lavó 4 veces la placa. Posteriormente, el estándar se llevó a dilución desde 1 ng/ml hasta el cero, inmediatamente se agregaron 100 µl de estándar o muestra por pozo por triplicado, y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Para llevar a cabo la detección se aspiró el líquido y se realizaron 4 lavados, se agregaron 100 µl por pozo del anticuerpo de detección a una concentración de 0.5 µg/ml y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h; terminando la incubación se aspiró el líquido y se realizaron 4 lavados, se agregaron por pozo 100 µl de Avidina-HRP conjugado a una dilución de 1:2000, para incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se aspiró el líquido, se realizaron 4 lavados y se agregaron 100 µl de solución ABTS por pozo; se incubó a temperatura ambiente para el desarrollo del color y finalmente se analizó la placa de ELISA a 405 nm fijando una corrección de la longitud de onda a 650 nm.

6.8.3. Cuantificación de TNF- α

Se utilizó el kit Mini ELISA TNF-α Humano (900-M25) de Peprotech. Para la preparación de la placa, se diluyó el anticuerpo de captura con PBS hasta una concentración de 1 µg/ml. Inmediatamente, se adicionaron 100 µl a la placa de ELISA. Se cubrió la placa y se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Después se removió el líquido y realizó 4 lavados con 300 µl de buffer de lavado por pozo. Posteriormente de lavar la placa, se invirtió para remover el residuo sobre una toalla de papel, se agregaron 300 µl de buffer de bloqueo por cada pozo. Se incubó durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se aspiró y lavó 4 veces el la placa. Posteriormente el estándar se llevó a dilución desde 2 ng/ml hasta el cero, inmediatamente se agregaron 100 µl de estándar o

muestra por pozo por triplicado, y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h. Para llevar a cabo la detección se aspiró el líquido y se realizaron 4 lavados, se agregaron 100 µl por pozo del anticuerpo de detección a una concentración de 0.5 µg/ml y se incubó a temperatura ambiente durante 2 h; terminando la incubación se aspiró el líquido y se realizaron 4 lavados, se agregaron por pozo 100 µl de Avidina-HRP conjugado a una dilución de 1:2000, para incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se aspiró el líquido, se realizaron 4 lavados y se agregaron 100µl de solución ABTS por pozo; se incubó a temperatura ambiente para el desarrollo del color y finalmente se analizó la placa de ELISA a 405 nm fijando una corrección de la longitud de onda a 650 nm.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de la expresión del receptor 5-HT_{5A} mediante *Western Blot,* se manejaron dos grupos, un grupo control de linfocitos de sujetos sanos y el grupo de linfocitos de personas con artritis reumatoide.

Se manejaron 3 grupos para los análisis de IL-1, IL-6 y TNF-α mediante ELISA, un grupo de los linfocitos de sujetos sanos, un segundo grupo de los linfocitos de pacientes con artritis reumatoide sin activador del receptor 5-HT_{5A} y un tercer grupo de linfocitos de pacientes con artritis reumatoide con activador del receptor 5-$HT_{5A.}$ De la misma forma, se manejaron los grupos para los análisis de muestras de sangre periférica.

Posteriormente, se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos mediante ANOVA, realizando pruebas post hoc Tukey y Dunnett.

8. RESULTADOS

8.1. Características clínicas de los participantes en el estudio

Se realizó un sumario clínico de las características de los pacientes y sujetos sanos participantes en el estudio con el fin de llevar un control (Cuadro 6).

Cuadro 6. Sumario clínico de participantes en el estudio.

Paciente	AR	Edad (años)	Sexo (M/F)	FR	PCR	Tratamiento
G-001	-	62	F	-	-	NT
G-002	+	65	F	+	+	Ibuprofeno
G-003	+	46	M	+	+	Diclofenaco
G-004	+	41	F	+	+	NT
G-005	-	65	F	-	-	Diclofenaco
G-006	-	76	M	-	-	NT
G-007	-	55	F	-	-	NT
S-001	-	25	M	-	-	NT
S-002	-	24	M	-	-	NT
S-003	-	25	F	-	-	NT
S-004	-	25	F	-	-	NT

Abreviaturas: NT: sin tratamiento, PCR: proteína C reactiva, G-xxx: código de paciente de Guanajuato, S-xxx: código paciente sano, AR: artritis reumatoide, FR: factor reumatoide.

8.2. Evaluación del efecto de la serotonina y ácido valerénico en cultivo celular de linfocitos de sujetos sanos.

Se llevó a cabo la evaluación del efecto de la serotonina en la activación de todos los receptores serotoninérgicos presentes en linfocitos de sujetos sanos, y el efecto de la activación del receptor 5-HT_{5A} por acción del ácido valerénico, los resultados mostraron una disminución de la proliferación celular con el tratamiento de serotonina a las concentraciones de $1x10^{-7}$ a $1x10^{-3}$ con diferencia significativa respecto al control (Figura 6); por otro lado, en el caso

de los cultivos a los que se les suministró el tratamiento de ácido valerénico, se observó una disminución de la proliferación de células PBMC con respecto al control en las concentraciones de $1x10^{-5}$ a $1x10^{-3}$ M (Figura 7).

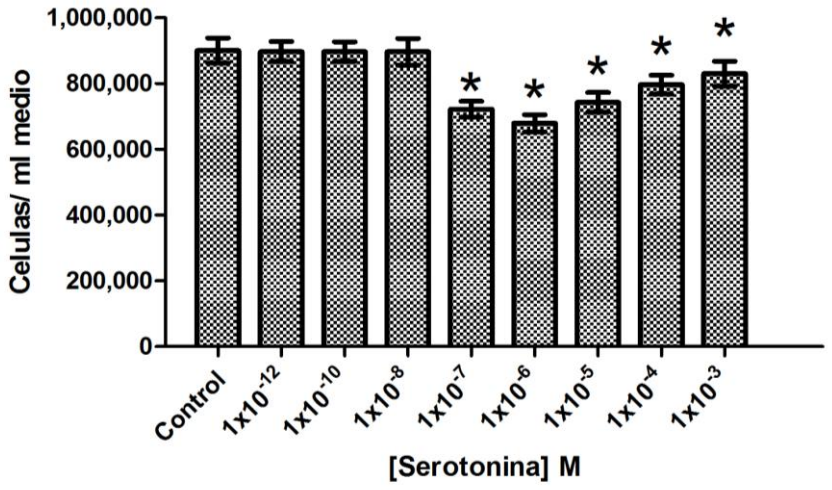

Figura 6. Efecto de la serotonina en la proliferación celular de linfocitos. Los resultados representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes; diferencia significativa comparado con el control, *p < 0.05. Dunnett test.

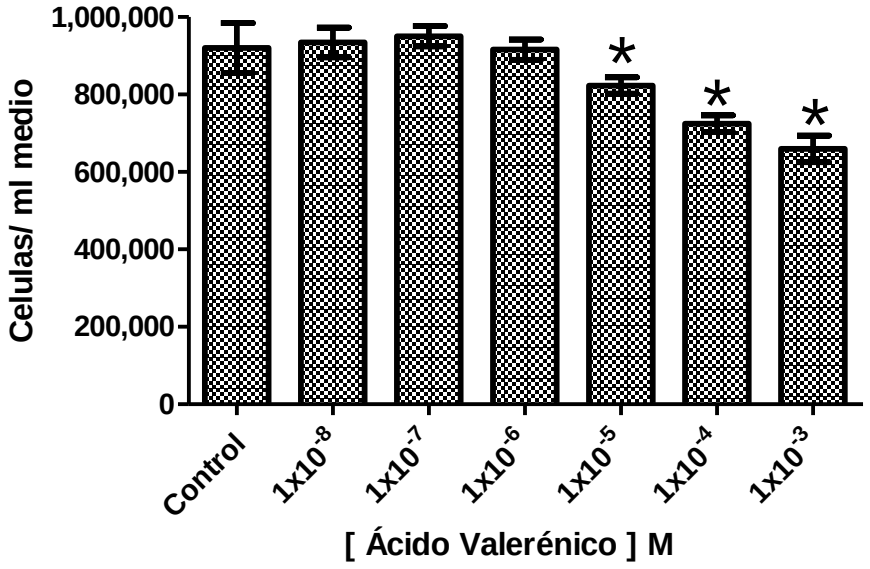

Figura 7. Efecto del ácido valerénico en la proliferación celular de linfocitos. Los resultados representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes; diferencia significativa comparado con el control, *p < 0.05. Dunnett test.

8.3. Evaluación del efecto del ácido valerénico en cultivo celular de linfocitos de pacientes con artritis reumatoide y células T Jurkat.

Después de obtener las concentraciones de ácido valerénico a las cuales se tenía efecto en la disminución sobre la proliferación celular de linfocitos, se llevó a cabo la evaluación de estas concentraciones ($1x10^{-6}$ y $1x10^{-3}$ M de ácido valerénico) sobre los linfocitos de pacientes con artritis reumatoide, obteniendo el mismo comportamiento que se observó en las muestras de sujetos sanos o sea una disminución de la proliferación celular, con una mayor diferencia significativa en la concentración más alta que corresponde a $1x10^{-3}$ M (Figura 8).

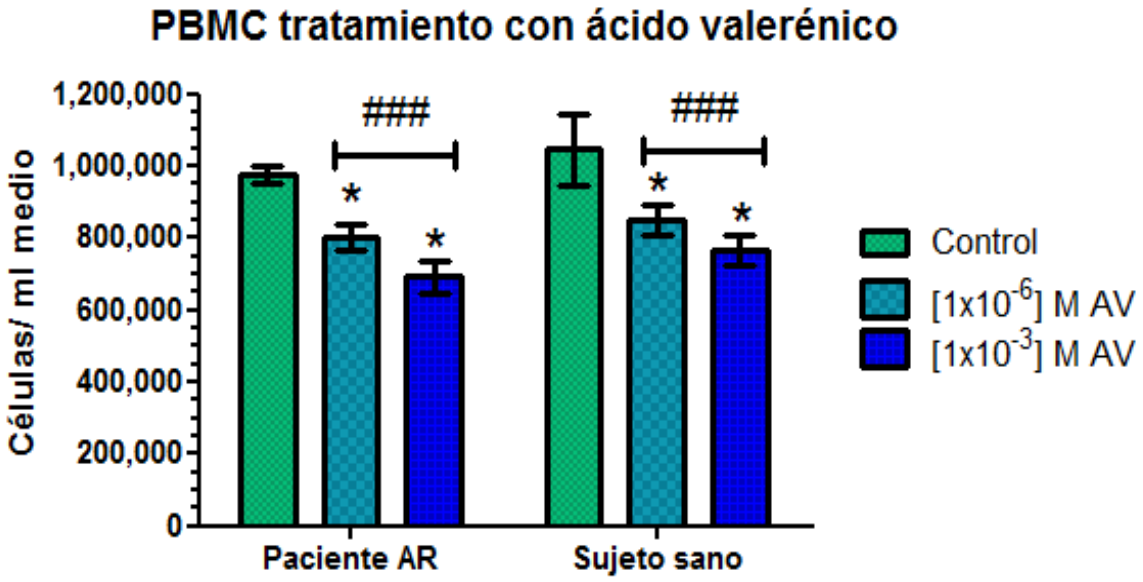

Figura 8. Efecto del ácido valerénico en la proliferación celular de linfocitos de pacientes con artritis reumatoide. Los resultados representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes; diferencia significativa comparado con el control, *$p < 0.05$. Dunnett test; diferencia significativa en tratamientos del mismo grupo ###$p < 0.001$. Tukey test.

Además, para comparar el efecto sobre una línea celular estable, se llevó a cabo una evaluación del efecto de las concentraciones de ácido valerénico de $1x10^{-10}$ a $1x10^{-3}$ M, sobre células T de línea celular tipo Jurkat, observando una inhibición de la proliferación celular a partir de la concentración de $1x10^{-8}$ M donde se presentó del 10% respecto al control, y con una inhibición de 20 % a la concentración de $1x10^{-6}$ a $1x10^{-3}$ M (Figura 9).

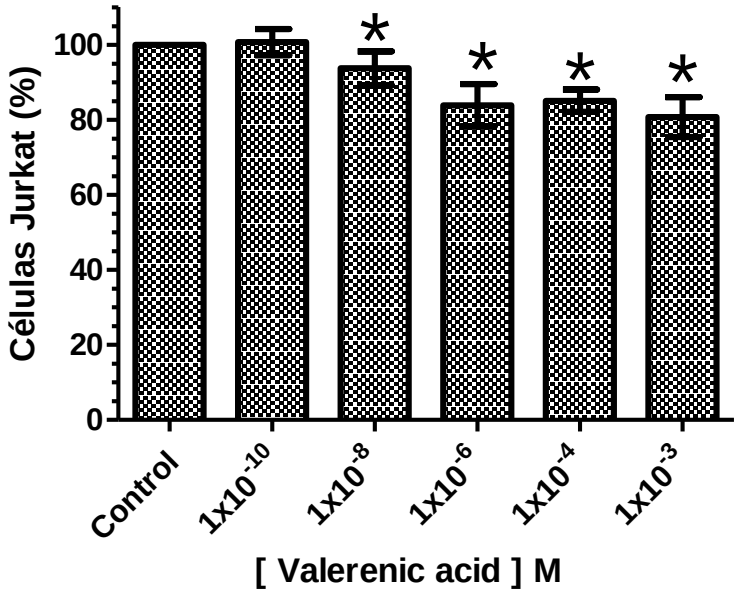

Figura 9. Porcentaje de inhibición de la proliferación de celulas T linea tipo Jurkat tratadas con ácido valerénico. Los resultados representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes; diferencia significativa comparado con el control, *$p < 0.05$. Dunnett test.

8.4. Evaluación de la expresión de la proteína del receptor 5-HT_{5A} en muestras de linfocitos de pacientes con artritis reumatoide.

Se llevó a cabo el análisis de la expresión de la proteína del receptor serotoninérgico 5-HT_{5A} en las muestras de linfocitos de pacientes con artritis reumatoide, los linfocitos tratados con ácido valerénico y linfocitos de sujetos sanos (Figura 10A), mediante la densitometría de las bandas presentadas en el *Western Blot*, observando diferencia estadística significativa en el

tratamiento de $1x10^{-3}$ M de ácido valerénico en las muestras de pacientes con artritis reumatoide (Figura 10B).

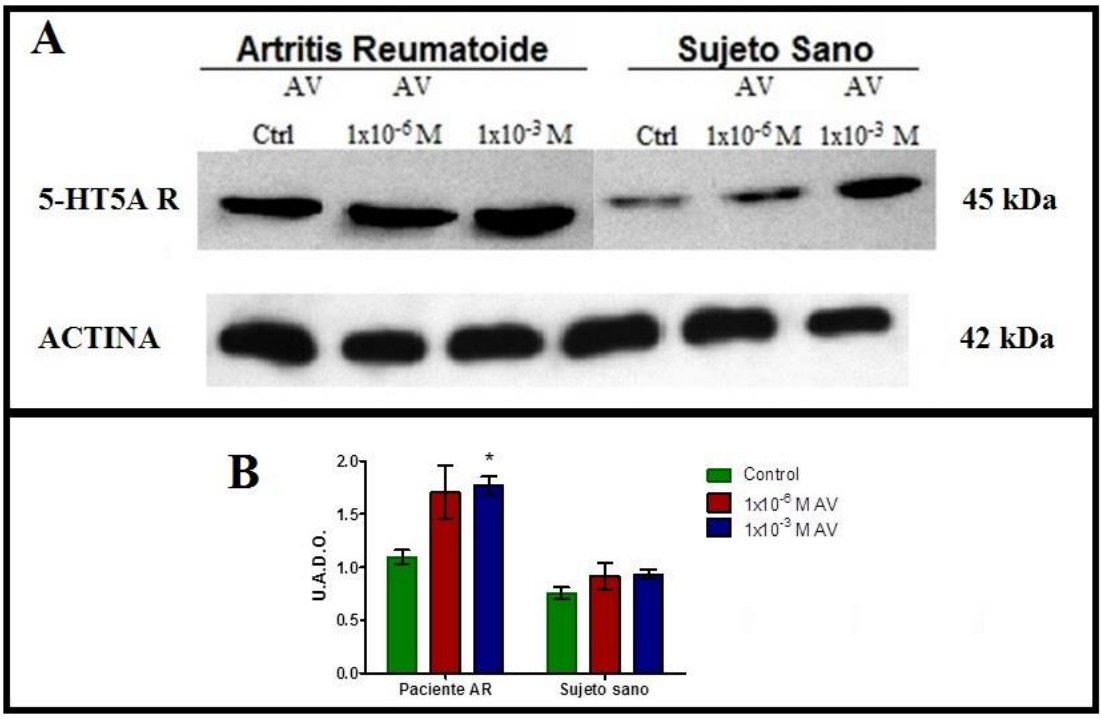

Figura 10. Western Blot del receptor 5-HT_{5A} en linfocitos de pacientes con artritis reumatoide y sujetos sanos, tratados con ácido valerénico. Los resultados representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes; diferencia significativa comparado con el control, *$p < 0.05$. Dunnett test. Abreviaturas: AV, Ácido Valerénico.

Posteriormente, se realizó el *Western Blot* de las muestras del linaje celular de linfocitos T tipo Jurkat, para evaluar la expresión del receptor 5-HT_{5A} (Figura 11A), en la cual, en la densitometría se observa que no existe modificación de la expresión del receptor con el tratamiento de ácido valerénico en ninguna de sus concentraciones (Figura 11B).

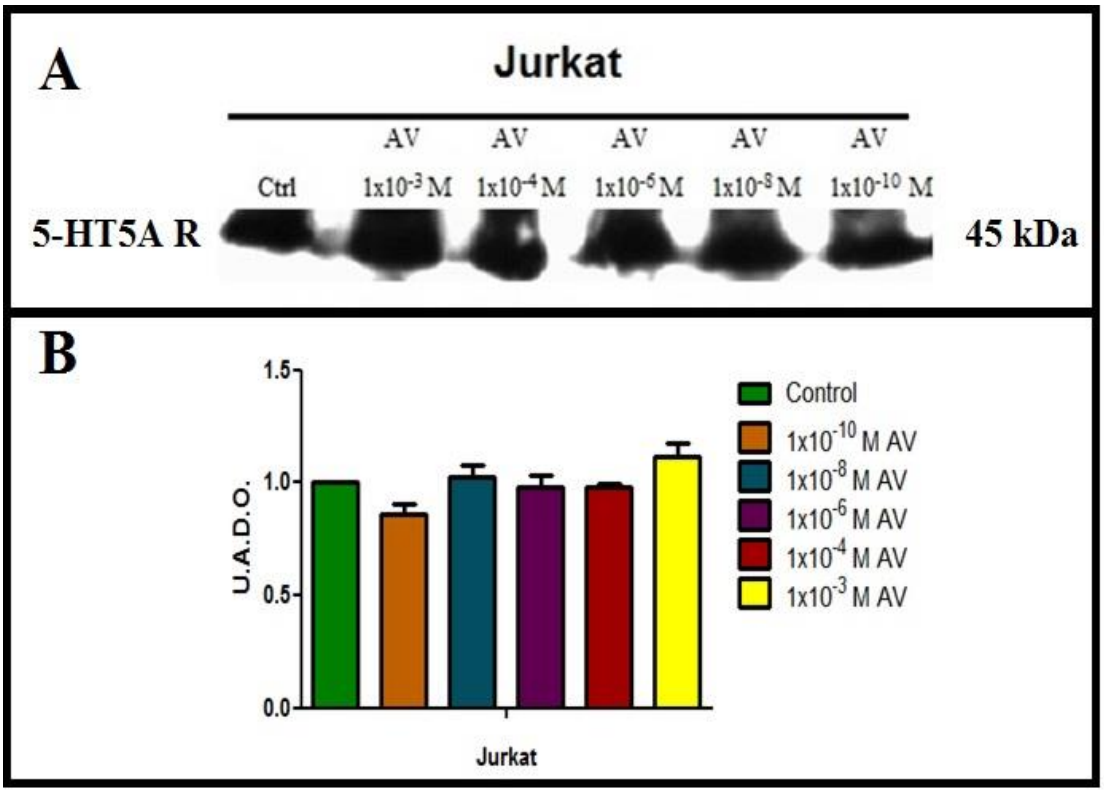

Figura 11. Western Blot del receptor 5-HT_{5A} en células Jurkat tratadas con ácido valerénico. Los resultados representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes; diferencia significativa comparado con el control, *$p < 0.05$. Dunnett test. Abreviaturas: AV, Ácido Valerénico.

8.5. Determinación de los niveles de citocinas proinflamatorias por efecto del ácido valerénico en los cultivos de linfocitos de pacientes con artritis reumatoide en comparación con sujetos sanos.

Se realizó la determinación de citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6 y TNF-α en linfocitos de sujetos sanos, de pacientes con artritis reumatoide, tomando en cuenta si éstos llevaban a cabo un tratamiento con AINE´s o no contaban con tratamiento antiinflamatorio, y de linfocitos T de línea celular tipo Jurkat, para determinar el efecto del ácido valerénico sobre la disminución del proceso inflamatorio a través de la expresión de citocinas proinflamatorias, mediante kit de ELISA.

En los niveles presentados de IL-6, se observa una disminución significativa de acuerdo a su respectivo control en los tratamientos de ácido valerénico $1x10^{-6}$ y $1x10^{-3}$ M, en las muestras de pacientes con artritis reumatoide que cuentan con tratamiento AINE (AR AINE) y los que no cuentan con ello (AR NTX), así como los sujetos sanos (Figura 12).

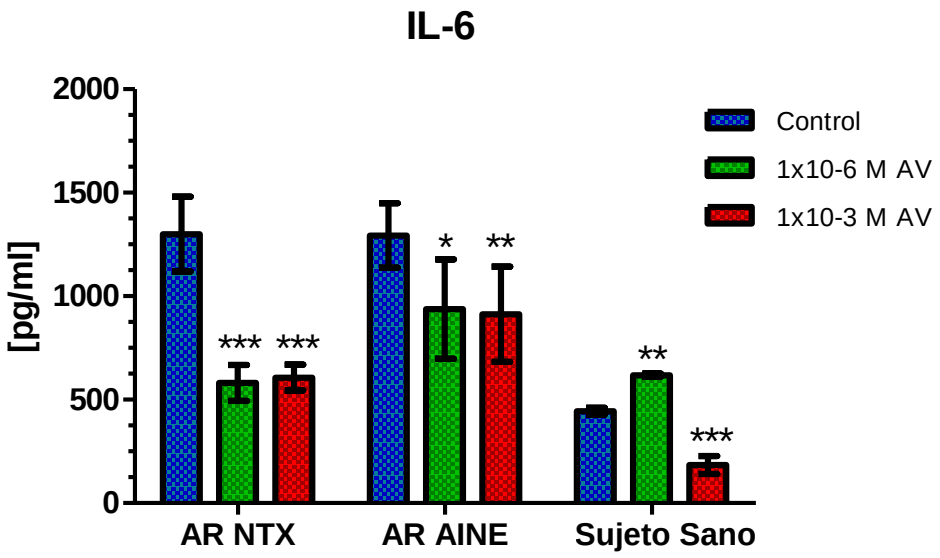

Figura 12. Expresión de citocina proinflamatoria IL-6 en linfocitos de sujetos sanos y pacientes con artritis reumatoide, tratados con ácido valerénico. Los resultados representan la media ± error estándar de tres experimentos independientes; diferencia significativa comparado con el control, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Dunnett test. Abreviaturas: AV, Ácido Valerénico; AR NTX, artritis reumatoide sin tratamiento; AR AINE, artritis reumatoide con tratamiento antiinflamatorio.

Al determinar los niveles de TNF-α en los linfocitos de pacientes con artritis reumatoide AR AINE, se observó una disminución significativa de TNF-α en la concentración $1x10^{-6}$ y $1x10^{-3}$ M de ácido valerénico. Por su parte, en los que no cuentan con tratamiento AR NTX y los sujetos sanos, no se observó diferencia significativa entre los tratamientos y sus respectivos controles (Figura 13).

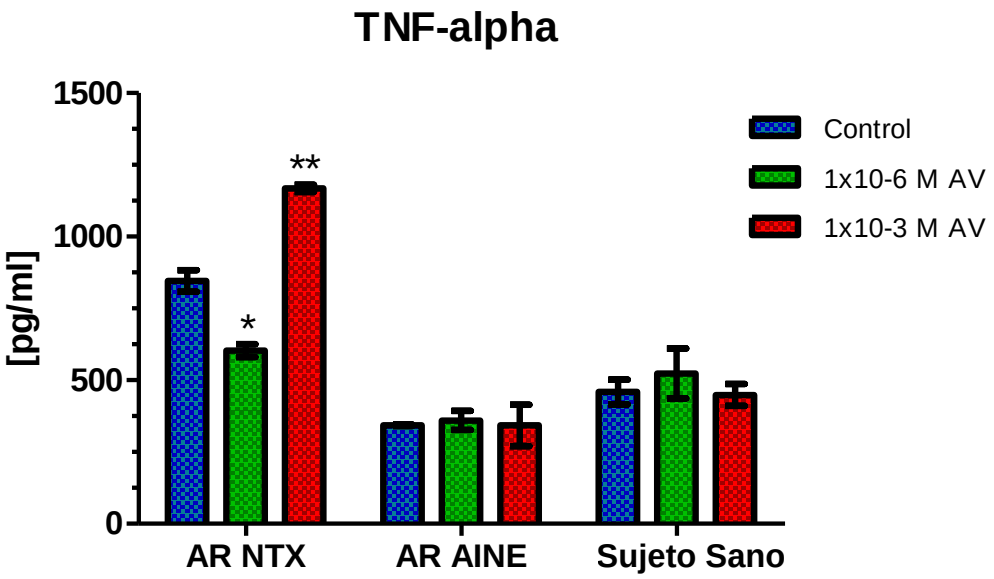

Figura 13. Expresión de TNF-α en linfocitos de sujetos sanos y pacientes con artritis reumatoide, tratados con ácido valerénico. Los resultados representan la media ± error estándar de tres experimentos independientes; diferencia significativa comparado con el control, *$p < 0.05$, **$p < 0.01$. Dunnett test. Abreviaturas: AV, Ácido Valerénico; AR NTX, artritis reumatoide sin tratamiento; AR AINE, artritis reumatoide con tratamiento antiinflamatorio.

Por otro lado, después de medir los niveles de la citocina proinflamatoria IL-1 en las muestras de artritis reumatoide sin tratamiento, se puede observar una disminución significativa en los tratamientos con $1x10^{-6}$ y $1x10^{-3}$ M de ácido valerénico. Por su parte, las muestras de artritis reumatoide con tratamiento AINE, así como las de sujeto sano no muestran diferencia significativa respecto al control (Figura 14).

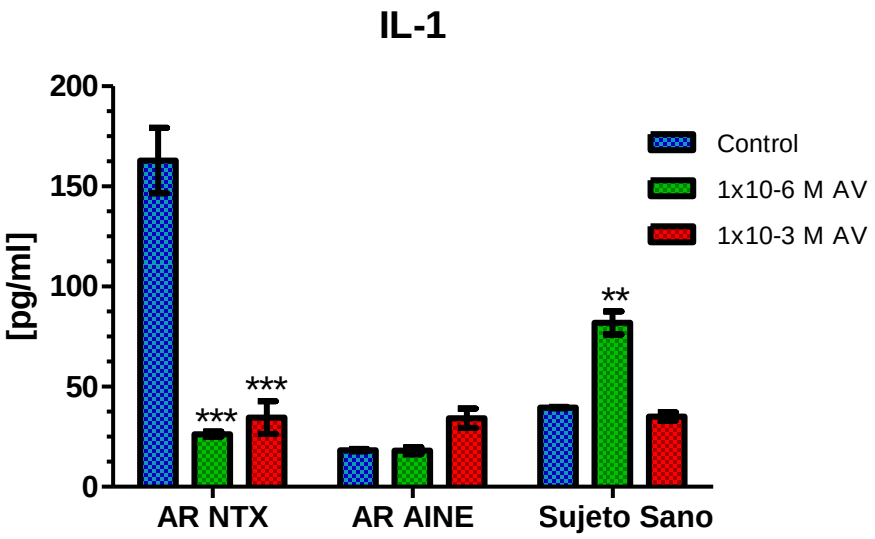

Figura 14. Expresión de TNF-α en linfocitos de sujetos sanos y pacientes con artritis reumatoide, tratados con ácido valerénico. Los resultados representan la media ± error estándar de tres experimentos independientes; diferencia significativa comparado con el control, **p < 0.01, ***p < 0.001. Dunnett test. Abreviaturas: AV, Ácido Valerénico; AR NTX, artritis reumatoide sin tratamiento; AR AINE, artritis reumatoide con tratamiento antiinflamatorio.

Finalmente, en la determinación de citocinas proinflamatorias en linfocitos T tipo Jurkat, se observó que la IL-6 disminuyo significativamente en las concentraciones $1x10^{-12}$ a $1x10^{-6}$ M AV con respecto al control. En los niveles de la IL-1 y TNF-α no se presentaron cambios significativos (Figura 15).

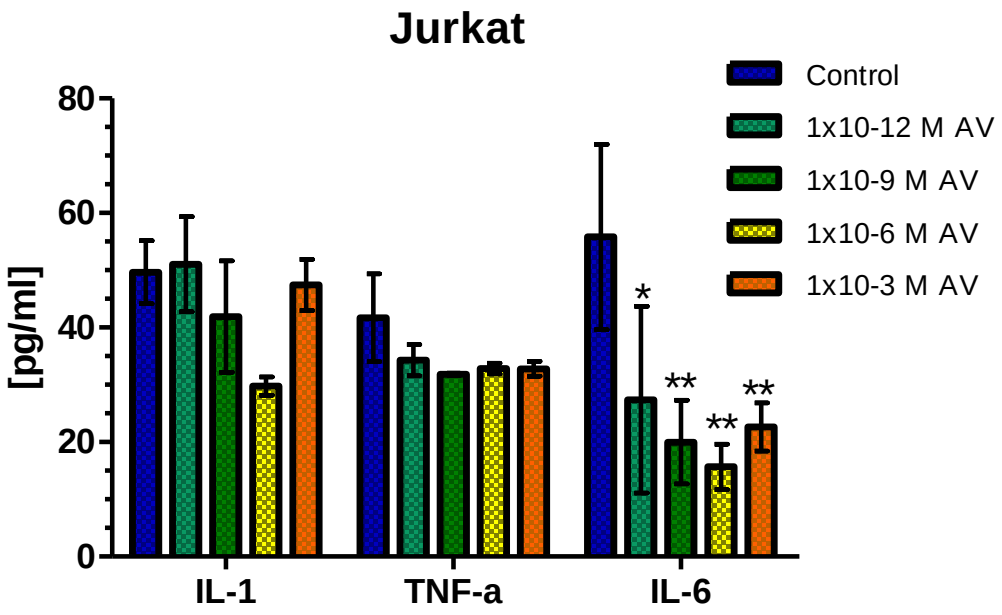

Figura 15. Expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF-α) en linfocitos de células T tipo Jurkat, tratados con ácido valerénico. Los resultados representan la media ± error estándar de tres experimentos independientes; diferencia significativa comparado con el control, *$p < 0.05$, **$p < 0.01$. Dunnett test. Abreviaturas: AV, Ácido Valerénico; R, receptor.

9. DISCUSIÓN

El trabajo de investigación que se presenta, corrobora la participación de serotonina y ácido valerénico como agonistas del receptor 5-HT_{5A}, en la respuesta inmune por parte de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en cultivo. Los resultados de proliferación de las células PBMC tratadas con serotonina a concentraciones desde $1x10^{-12}$ a $1x10^{-3}$ M, muestran un comportamiento diferente entre cada tratamiento. La proliferación celular disminuye a partir de la concentración de $1x10^{-7}$ M hasta $1x10^{-3}$ M, sin embargo a partir de $1x10^{-5}$ M la disminución no es tan diferente significativamente con respecto al control. Estos resultados pueden explicarse desde el punto de vista de que las células mononucleares de sangre periférica humana cuentan con una gran diversidad de receptores serotoninérgicos. Existen 7 familias de receptores 5-HT y se ha reportado que las células PBMC expresan los receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{1F}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_6 y 5-HT_7 (Stefulj *et al.,* 2000). También se han identificado los mRNA de los receptores 5-HT_{2C} y 5-HT_{5A} (Marazziti *et al.,* 2001) y la presencia del receptor 5-HT_{5A} (Rodriguez-Cruz, 2013), por lo cual la respuesta ante el estímulo de un ligando común como lo es la serotonina será diferente, dependiendo de la concentración de serotonina que se utilice, y teniendo en cuenta que los receptores serotoninérgicos tienen una constante de afinidad a la serotonina (Ki) diferente entre sí.

Los receptores que cuentan con una mayor afinidad a serotonina como los receptores 5-$HT_{1B/E/F}$, 5-$HT_{2A/B}$ y 5-HT_7, que tienen una Ki < 10 nM (Berger *et. al.*, 2009; Hoyer *et. al.,* 1994), serían los primeros en activarse a concentraciones de $1x10^{-7}$ a $1x10^{-6}$ M de serotonina. La respuesta mediada por los receptores 5-HT_1, al ser acoplados a una proteína Gi, involucra la inhibición de la vía de señalización dependiente de cAMP; por consecuencia, no se lleva a cabo la fosforilacion de PKA que es necesaria para la activación de factores tales como CREB y factores inflamatorios como lo es NF-κB, necesarios para

la expresión de proteínas de supervivencia celular. Por lo tanto, la regulación de la expresión de proteínas de supervivencia celular se vería bloqueada y de esta manera la proliferación celular se ve comprometida (Figura 6). Dicho comportamiento obtenido en PBMC humanos es consistente con lo reportado por Stefulj *et al.* (2002), quienes observaron una disminución en la proliferación de linfocitos de rata con tratamientos de serotonina $6x10^{-4}$ y $2x10^{-3}$ M. El receptor 5-HT_7 mediaría su acción de manera positiva sobre las células PBMC, esto ha sido demostrado por León-Ponte *et al.* (2007), quienes observaron que además de sintetizar serotonina, las células T son reguladas de manera autocrina, de esta manera son activadas. De la misma forma, los receptores 5-HT_2, podrían regular las células de manera positiva en la proliferación, debido a que en otros trabajos se ha observado la capacidad de dichos receptores para llevar a cabo esta acción sobre osteoblastos, al utilizar antagonistas de receptores 5-HT_2 (Gustafsson *et al.,* 2006). Posteriormente, al aumentar la concentración de serotonina en el rango de $1x10^{-5}$ a $1x10^{-3}$ M, encontramos que la diferencia significativa es menor respecto al control (Figura 6); los receptores 5-HT_4 y 5-HT_6 con una Ki ≈50 nM, y acoplados a una proteína Gs, estarían compitiendo por la activación de su propia vía de señalización. La activación de la vía de señalización por cAMP promovería la proliferación celular, que en competencia con los otros receptores se refleja en la recuperación de la tasa de proliferación control. Esta condición proliferativa por la serotonina ya ha sido observada en otros tipos celulares. Tal es el caso de células de cáncer de mama humano, donde la serotonina tiene un papel positivo para la supervivencia y proliferación inapropiada (Pai *et al.,* 2009). Otro tipo celular en el cual la serotonina puede actuar de manera proliferativa en osteoblastos, donde Gustafsson *et al.* (2006) observaron que al utilizar concentraciones del orden de µM, la proliferación de este tipo de células aumenta significativamente respecto al control.

El ácido valerénico se conoce como un agonista parcial de los receptores 5-HT_{5A} y 5-HT_{2B}, con una selectividad mayor por el receptor 5-HT_{5A} (Dietz *et. al*.,

2005). En los tratamientos con ácido valerénico, se logra observar una disminución de la proliferación celular desde $1x10^{-6}$ hasta $1x10^{-3}$ M, por lo cual es dependiente de la concentración (sin la recuperación que se obtuvo en el tratamiento con serotonina); la posible razón por la cual se observa este efecto es por la activación del receptor 5-HT_{5A}, al estar acoplado a una proteína Gi, inhibiría la vía de señalización por cAMP (Figura 7). Esta tendencia en la disminución de la proliferación se puede observar de la misma forma en los linfocitos de muestras de pacientes con AR, presentándose en las concentraciones $1x10^{-6}$ y $1x10^{-3}$ M de ácido valerénico (Figura 8).

Los tratamientos en cultivos de PBMC se compararon con cultivos de células Jurkat, que son linfocitos T inmortalizadas de leucemia linfoide aguda. En el caso del tratamiento con ácido valerénico sobre la línea celular Jurkat, la disminución de la proliferación celular es menor a la presentada en linfocitos de las muestras de pacientes con artritis reumatoide y de pacientes sanos; este comportamiento puede ser debido a que este linaje celular es de tipo cancerígeno, por lo cual los linfocitos desarrollan mecanismos de defensa y/o supervivencia que impiden la acción del ácido valerénico en el receptor 5-HT_{5A} (Figura 9). Este comportamiento de resistencia es consistente con Mendieta-Trejo (2014), donde se observó que linfocitos T Jurkat no muestran un efecto sobre la proliferación al ser tratados con serotonina, por lo cual al ser un agonista de los receptores serotoninergicos se espera que la acción sea similar en la utilización del ácido valerénico. Aunado a esto, la proliferación de células T depende de un antígeno y/o la co-estimulación de contacto célula - célula, fenómeno que no se estaría llevando a cabo (Moreno, 2003).

Las vías de señalización que se activarían al realizar los tratamientos con ácido valerénico serían las de los receptores 5-HT_{5A} y 5-HT_{2B}, ya que se ha reportado que el ácido valerénico es capaz de unirse como agonista parcial de dichos receptores a la concentración de 50 µg/ml ($2x10^{-4}$ M), con una unión de 80 % y 50 % respectivamente (Dietz *et al*., 2005). La vía de señalización del receptor

5-HT_{5A} (acoplado a proteína Gi), se llevaría a cabo al activarse por el ácido valerénico, bloquearía la cascada de señalización del adenilato ciclasa (AC). Por consiguiente, PKA no se activaría (Francken *et al*., 1998). De acuerdo a Zhong *et al*. (1997) PKA fosforila a IκBα (inhibidor de kappa B), dicha acción no se llevaría a cabo. Por lo cual, IκBα se separara de NF-κB, y este último se transloca al núcleo. NF-κB podrá transcribir genes de supervivencia celular. Además, fosforila el factor de transcripción CREB, que es necesario para la transcripción de factores de supervivencia e inflamación. Por lo tanto, la proliferación y supervivencia celular de los linfocitos se vería comprometida por la inhibición de estas vías, por la acción del receptor 5-HT_{5A}. Por otro lado, la activación en menor medida del receptor 5-HT_{2B} (acoplado a proteína Gq) por el ácido valerénico activaría la vía de señalización de PLC, que aumentaría los niveles de PKC, y de acuerdo a lo reportado por Blonska y Lin (2011) existe una familia de proteínas denominadas CARMA (1,2 y 3), las cuales, en el caso de CARMA3 se ha observado que es fosforilado por PKC, ésta fosforilación forma el complejo CBM (carma3-bcl10-malt1), el cual fosforila el complejo Iκβ kinasa (IKK), para que a su vez fosforilara IκBα (inhibidor de kappa B). De este modo, se separará NF-κB, se transloca al núcleo y podrá llevar a cabo la transcripción de genes de supervivencia celular. De esta forma la disminución de la supervivencia celular estaría atenuada por el receptor 5-HT_{2B} y la disminución de linfocitos mediada por 5-HT_{5A}.

Al realizar la determinación de la expresión proteica del receptor 5-HT_{5A} en los cultivos de linfocitos de sujetos sanos y de pacientes con artritis reumatoide, se observó un aumento en la concentración de $1x10^{-3}$ M de ácido valerénico, solo para el caso de linfocitos de pacientes con artritis reumatoide (Figura 11A). Además, no se presenta cambio en la expresión de receptores serotoninérgicos por acción de factores presentes en el cultivo, y se ha observado, que el uso de fitohemaglutinina que después de 100 h no modifica la expresión de receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{2C} en PBMCs (Yin *et al*., 2006). Por otra parte, la artritis reumatoide en los linfocitos no modifican la expresión de

receptores serotoninérgicos, como se observó en la expresión del control de pacientes con artritis reumatoide, y esto es consistente con otras patologías como la diabetes mellitus donde receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B} no se modifican en ratones diabéticos con respecto a ratones sanos (Nelson *et al*., 2012). Sin embargo, el uso del ácido valerénico a concentración $1x10^{-3}$ M aumenta la expresión del receptor en PBMC de pacientes con artritis reumatoide, esto es benéfico debido a que aumenta la disponibilidad del receptor para su unión con el ligando. Por lo tanto, la disponibilidad del receptor en PBMCs y la expresión del receptor 5-HT_{5A}, no se ve comprometida por la patología (AR) y es aumentada por concentraciones mM de ácido valerénico.

La disminución de citocinas proinflamatorias principalmente de IL-6 en las muestras de pacientes con artritis reumatoide con y sin tratamiento con AINE, sujeto sano y de los linfocitos T tipo Jurkat, por la acción del ácido valerénico se estaría llevando a cabo mediante el receptor 5-HT_{5A} que al activarse se inhibe la vía del adenilato ciclasa, por lo tanto se ven comprometidos los niveles de cAMP, segundo mensajero que se ha comprobado estar directamente relacionado con la activación de factores de transcripción como lo son CREB-1, c-FOS, NF-κB, que promueven la transcripción de interleucinas IL-1 e IL-6 (Grassl, 1999). Todo ésto, es consistente con lo reportado por Jacobo-Herrera *et al*. (2006), reporte donde se observó que el ácido valerénico es capaz de inhibir el factor de transcripción NF-κB en células HeLa. De esta manera, se podría deducir que el ácido valerénico al activar el receptor 5-HT_{5A}, inhibe la vía del adenilato ciclasa, con ello no se transcriben las citocinas proinflamatorias (Figura 12 y 15). Sin embargo, esta disminución en los niveles de citocinas proinflamatorias estaría regulada por la acción del receptor 5-HT_{2B}, el cual es también activado en menor medida por el ácido valerénico, como ocurrió con la proliferación celular. Además, Kubera *et al*. (2005) observaron que la serotonina en concentraciones fisiológicas incrementa los niveles de IL-6 mediante la activación del receptor 5-$HT_{2B/2C}$, y a concentraciones mayores

puede inhibirla. Por otro lado, en osteocitos se elevan los niveles de IL-6 en respuesta a la estimulación de 5-HT_{2B}, a través de la vía de ERK 1/2 (Li *et al*., 2013).

En el caso de los niveles presentados de IL-1, en los cuales se observan niveles por debajo de 200 pg/ml, se entiende que esta citocina proinflamatoria está ligada al daño articular del cartílago presente en la membrana sinovial, por la producción de metaloproteinasas de matriz. Sin embargo, esto ocurre como un proceso en el tejido *in vivo*. De esta manera, cuando se realizó el cultivo celular de manera *in vitro*, no se observan cambios en la secreción de esta interleucina cuyos niveles permanecieron bajos (Figura 14) (Fox, 2001; Hale y Hanes; 2001).

Las células T Jurkat expresan interleucinas de tipo proinflamatorias que son dependientes de factores transcripcionales como AP-1 y NF-κB, solo en respuesta a su activación con algún compuesto comúnmente utilizado para la activación de células T, como el PMA (Forbol 12-miristato 13-acetato). Se ha las citocinas: IL-6, TNF-α y CXCL8 en cultivos control, muestra niveles por debajo de 10-40 pg/ml. Sin embargo, al exponer las células a PMA después de 24 h aumentan significativamente respecto a los controles, mostrando niveles por encima de 100-300 pg/ml (Khalaf *et al.,* 2010). Los ensayos realizados en este proyecto tiene consistencia con lo presentado por Khalaf *et al.* (2010), a excepción de la IL-6, en la cual se logra observar la disminución del nivel basal en este tipo de células T.

Se propone el siguiente mecanismo de acción del ácido valerénico a través de los receptores 5-HT_{5A} y 5-HT_{2B} en linfocitos de pacientes con artritis reumatoide, para la regulación de la supervivencia celular y control de transcripción de interleucinas proinflamatorias y TNF- α (Figura 14).

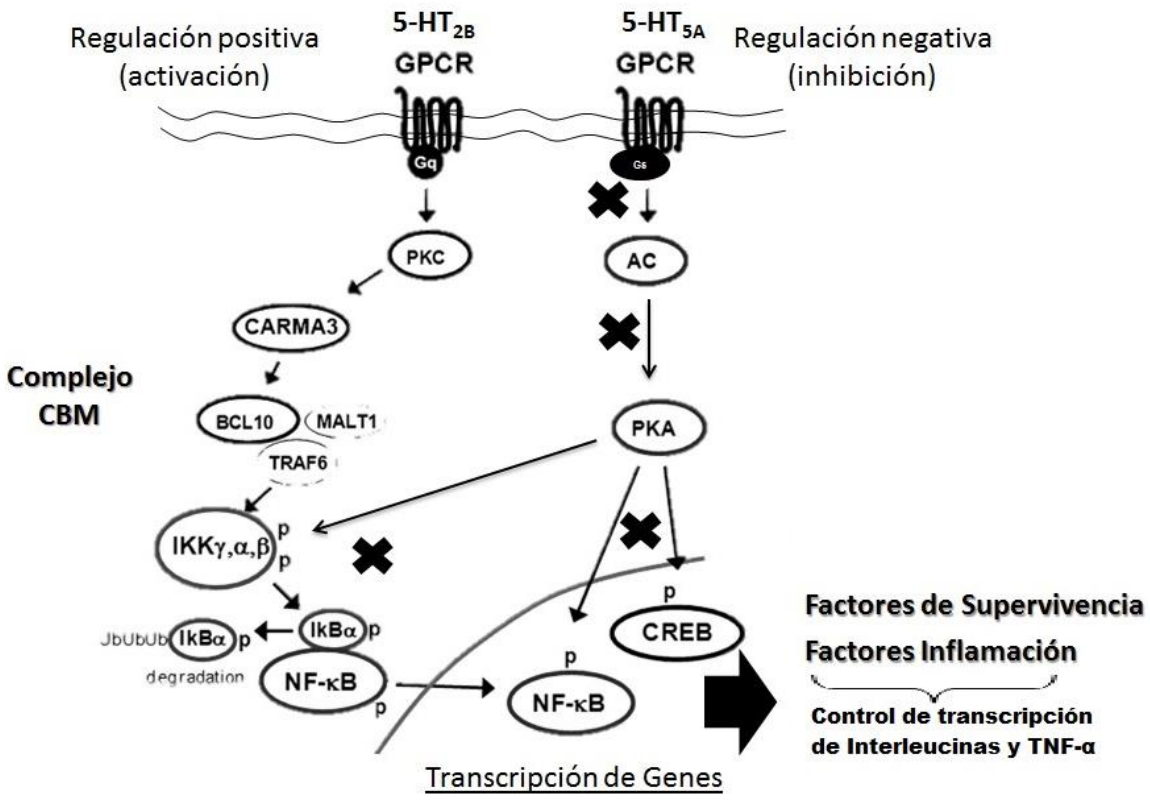

Figura 16. Posible Mecanismo de acción del ácido valerénico a través de los receptores 5-HT_{5A} y 5-HT_{2B} (Modificado de Fraser, 2008).

10. CONCLUSIONES

- El ácido valerénico disminuye la proliferación de PBMC y linfocitos T jurkat mediante la activación del receptor 5-HT_{5A}.

- El ácido valerénico disminuye la expresión de la citocina proinflamatoria IL-6 mediante la activación del receptor 5-HT_{5A}.

- El ácido valerénico en concentraciones mM aumenta la expresión proteica del receptor 5-HT_{5A} en PBMC.

11. REFERENCIAS

Akar S, Birlik M, Gurler O, Sarai I, Onen F, Manisali M, Tirpan K, Demir T, Meral M, Akkoc N. **2004**. The prevalence of rheumatoid arthritis in an urban population of Izmir-Turkey. Clin Exp Rheumatol. 22:416-420.

Akiyoshi T, Zhang Q, Inoue F, Aramaki O, Hatano M, Shimazu M, Kitajima M, Shirasugi N, Niimi M. **2006**. Induction of indefinite survival of fully mismatched cardiac allografts and generation of regulatory cells by sarpogrelate hidrochloride. Transplantation. 82:1051-1059.

Alamanos Y, Drosos AA. **2005**. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. Autoimmun Rev. 4:130-136.

Albayrak A, Halici Z, Cadirci E, Polat B, Karakus E, Bayir Y, Unal D, Atasoy M, Dogrul A. **2013**. Inflammation and peripheral 5-HT_7 receptors: The role of 5-HT_7 receptors in carrageenn induced inflammation in rats. Eur J Pharmacol. 715:270-279.

Aletaha D, Neogi T, Silman A, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JMW, Hobbs K, Huizinga TWJ, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Menard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Somolen JS, Stanislawska-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch K, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G. **2010.** Rheumatoid Arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. Arthritis Rheum. 69:1580-1588.

Andrianakos A, Trontzas P, Christoyannis F, Dantis P, Voudouris C, Georgountzos A, Kaziolas G, Vafiadou E, Pantelidou K, Karamitsos D, Kontelis L, Krachtis P, Nikolia Z, Kaskani E, Tavaniotou E, Antoniades C, Karanikolas G, Kontoyanni A. **2003**. Prevalence of rheumatic diseases in Greece: a cross-sectional population based epidemiological study. J Rheumatol. 30:1589-1601**.**

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra SH, Medsger TA, Mitchell DM, Neustadt DH, Pinals RS, Schaller JG, Sharp JT, Wilder RL, Hunder GG. **1988**. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheum. 31(3):315-324.

Banal F, Dougados M, Combescure C, Gossec L. **2009**. Sensitivity and specificity of the American College of Rheumatology 1987 criteria for the diagnosis of rheumatoid arthritis according to disease duration: a systematic literature review and meta-analysis. Ann Rhem Dis. 68:1184-1191.

Begovich AB, Carlton VEH, Honigberg A, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SYP, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ, Gregersen PK. **2004**. A Missense Sigle-Nucleotide Polymorphism in a Gene Encoding a Protein Tyrosine Phosphatase (PTPN22) Is Associated with Rheumatoid Arthritis. Am J Hum Genet. 75:330-337.

Berger M, Gray JA, Roth BL. **2009**. The expanded Biology of Serotonin. Annu Rev Med. 60:355-366.

Blonska M, Lin X. **2011**. NF-κB signaling pathways regulated by CARMA family of scaffold proteins. Cell Res. 21: 55-70.

Capellino S, Cosentino M, Wolf C, Schmind M, Grifka J, Straub RH. **2010**. Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target. Ann Rheum Dis. 69(10):1853-1860.

Carmona L, Villaverde V, Hernandez-Garcia C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A. **2002**. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. Rhematology. 41:88-95.

Choy EHS, Isenberg DA, Garrood T, Farrow S, Ioannou Y, Bird H, Cheung N, Williams B, Hazleman B, Price R, Yoshizaki K, Nishimoto N, Kishimoto

T, Panayi GS. **2002**. Therapeutix Benefit of Blocking Interleukin-6 Activity With an Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal Antibody in Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheum. 46(12):3143-3150.

Cohen SB, Dore R K, Lane NE, Ory PA, Peterfy CG, Sharp JT, Van der Heijde D, Zhou L, Tsuji W, Newmark R. **2008**. Denosumab Treatment Effects on Structural Damage, Bone Mineral Density, and Bone Turnover in Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheum. 58:1299-1309.

Dai SM, Han XH, Zhao DB, Shi YQ, Liu Y, Meng JM. **2003**. Prevalence of rheumatic symptoms, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and gout in Shanghai, China: a COPCORD study. J Rheumatol. 30:2245-2251.

De Almeida DE, Ling S, Pi X, Hartmann-Scruggs AM, Pumpens P, Holozhitz J. **2010**. Immune Dysregulation by the Rheumatoid Arthritis Shared Epitope. J Immunol. 185:1927-1934.

de las casas-**Engel** M, Domínguez-Soto A, Sierra-Filardi E, Bragado R, Nieto C, Puig-Kroger A, Samaniego R, Loza M, Corcuera MT, Gómez-Aguado F, Bustos M, Sánchez-Mateos P, Corbí AL. **2013**. Serotonin Skews Human Macrophage Polarization through HTR2B and HTR7. J Immunol. 190:2301-2310.

De Rycke L, Peene I, Hoffman IEA, Kruithf E, Union A, Meheus L, Lebeer K, Wyns B, Vincent C, Mielants H, Boullart L, Serre G, Veys EM, De Keyser F. **2004**. Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. Ann Rheum Dis. 63:1587-1593.

Dietz BM, Mahady GB, Pauli GF, Farnsworth NR. **2005**. Valerian extract and valerenic acid are partial agonists of the 5-HT5a receptor in vitro. Mol Brain Res. 138: 191-197.

Doran MF, Pond GR, Crowson CS, Fallon WM, Gabriel SE. **2002**. Trends in incidence and mortality in rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, over a forty-year period. Arthritis Rheum. 46:625-631.

Dürk T, Panther E, Müller T, Sorichter S, Ferrari D, Pizzirani C, Di Virgilio F, Myrtek D, Norgauer J, Idzko M. **2005**. 5-Hydroxytryptamine modulates cytokine and chemokine production in LPS-primed human monocytes via stimulation of different 5-HTR subtypes. Int Immunol. 17:599-606.

Fox DA. **2001**. In Arthritis and Allied Condition: Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. 14th Ed. Editor Lippincot Williams & Wilkins. Philadelphia, USA. 1085-1102.

Francken BJB, Jurzak M, Vanhauwe JFM, Luyten WHML, Leysen JE. **1998**. The human 5-ht5A receptor couples to Gi/Go proteins and inhibits adenylate cyclase in HEK 293 cells. Eur J Pharmacol. 361: 299-309.

Fraser CC. **2008**. G Protein-Coupled Receptor Connectivity to NF-Kb in Inflammation and Cancer. Int Rev Immunol. 27: 320-350.

Gabriel SE, Crowson CS, O´Fallon WM. **1999**. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, 1955-1985. Arthritis Rheum. 42:415-420.

Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM, Doran MF, Turesson C, O´Fallon WM, Matteson EL. **2003**. Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. Arthritis Rheum. 48:54-58.

Grassl C, Luckow B, Schlöndorff D, Dendorfer U. **1999**. Transcriptional Regulaton of the Interleukin-6 Gene in Mesangia Cells. J Am Soc Nephrol. 10:1466-1477.

Guillemin F, Briancon S, Klein JM, Sauleau E, Pourel J. **1994**. Low incidence of rheumatoid arthritis in France. Scand J Rheumatol. 23:264-8.

Gustafsson BI, Thommesen L, Stunes AK, Tommeras K, Westbroek I, Waldum HL, Slørdahl K, Tamburstuen MV, Reseland JE, Syversen U. **2006.** Serotonin and Fluoxetine Modulate Bone Cell Function In Vitro. J Cell Biochem. 98:139-151.

Hale LP, Haynes BF. **2001**. In Arthritis and Allied Condition: Pathology of Rheumatoid Arthritis and Associates Disorders. 14th Ed. Editor Lippincot Williams & Wilkins. Philadelphia, USA. 1103-1127.

Harris EDJr. **1993**. Reumatology: Rheumatoid Arthritis: Etiology and Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. 4th Ed. Editor WB Sauders. Philadelphia, USA. 833-873.

Hoyer D, Clarke DR, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PPA. **1994**. VII International Union of Pharmacology Classification of Receptors for 5-Hydroxytryptamine (serotonin). Pharmacol Rev. 46(2): 157-203.

Idzko M, Panther E, Stratz C, Müller T, Bayer H, Zissel G, Dürk T, Soricter S, Di Virgilio F, Fiebich B, Heroux V, Elsner P, Norgauer J, Ferrari D. **2004**. The serotoninergic receptors of human dendritic cells: Identification and Coupling to Cytokine Release. J Immunol. 172:6011-6019.

Ioan-**Facsinay** A, Willemze A, Robinson DB, Peschken CA, Markland J, Van der Woude D, Elias B, Ménard HA, Newkirk M, Fritzler MJ, Toes REM, Huizinga TWJ, El-Gabalawy HS. **2008**. Marked differences in fine specificity and isotype usage of the anti-citullinated protein antibody in health and disease. Arthritis Rheum. 68:3000-3008.

Jacobo-**Herrera** NJ, Vartiainen N, Bremmer P, Gibbons S, Koistinaho J, Heinrich M. **2006**. NF-κB Modulators from Valeriana officinalis. Phytother Res. 20: 917-919.

Källberg H, Padyukov L, Plenge RM, Rönnelid J, Gregersen PK, Van der Helm-Van Mil AHM, Toes REM, Huizinga TWJ, Klareskog L, Alfredsson L. **2007**. Gene-Gene and Gene-Environment Interactions Involving HLA-DRB1, PTPN22, and Smoking in Two Subsets of Rheumatoid Arthritis. Am J Hum Genet. 80:867-875.

Khalaf H, Jass J, Olsson P. **2010**. Differential cytokine regulation by NF-κB and AP-1 in Jurkat T-cells. BMC Immunol. 11:26

Khurana R, Berney SM. **2005**. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. Pathophysiology. 12:153-165.

Kim JJ, Bridle BW, Ghia JE, Wang H, Syed SN, Manocha MM, Rengasamy P, Shajib MS, Wan Y, Hedlund PB, Khan WI. **2013**. Targeted Inhibition of Serotonin Type 7 (5-HT7) Receptor Function Modulates Inmune

Responses and Reduces the Severity of Intestinal Inflammation. J Immunol. 190: 4795-4804.

Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. **2008**. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. Annu Rev Immunol. 26:651-675.

Klareskog L, Stolt P, Lundberg K, Källberg H, Bengtsson C, Grunewald J, Rönnelid J, Harris HE, Ulfgren AK, Rantappä-Dahlqvist S, Erlund A, Padyukov L, Alfredsson L. **2006**. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 54(1):38-46.

Kling A, Rantapää-Dahlqvist S, Stenlund H, Mjörndal T. **2006**. Decreased density of serotonin 5-HT2A receptors in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 65:816-819.

Kubera M, Maes M, Kenis G, Kim Y, Lasón W. **2005**. Effects of serotonin and serotoninergic aganists and antagonists on the production of tumor necrosis factor α and interleukin-6. Psychiatry Res. 134:251-258.

Kuriya B, Cheng CK, Chen HM, Bykerk VP. **2009**. Validation of a prediction rule for development of rheumatoid arthritis in patients with early undifferentiated arthritis. Ann Rheum Dis. 68:1482-1485.

Kurreeman FAS, Padyukov L, Marques RB, Schrodi SJ, Seddighzadeh M, Stoeken-Rijsbergen G, Van der Helm-Van Mil AHM, Allaart CF, Verduyn W, Houwing-Duistermaat J, Alfredsson L, Begovich AB, Klareskog L, Huizinga TWJ, Toes REM. **2007**. A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. PLoS med. 4(9):1515-1524.

Lefévre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, Korb A, Schnäker EM, Tamer IH, Robbins PD, Evans CH, Stürz H, Steimeyer J, Gay S, Schölmerich J, Pap T, Müller-Lander U, Neumann E. **2009**. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. Nat Med. 15:1414-1420.

León-Ponte M, Ahern GP, O´Connell PJ. **2007.** Serotonin provides an accesory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor. Blood. 109: 3163-3172.

Li X, Ma Y, Wu X, Hao Z, Yin J, Shen J, Li X, Zhang P, Wang H. **2013**. Serotonin acts as a novel regulator of interleukin-6 secretion on osteocytes through the activation of the 5-HT2B receptor and the ERK1/2 signalling pathway. Biochem Biophys Res Commun. 441: 809-814.

Luster AD. **1998**. Chemokines. Chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med. 338:436-445.

MacGregor A, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, Silman AJ. **2000**. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. Arthritis Rheum. 43(1):30-37

Mahdi H, Fisher BA, Källberg H, Plant D, Malmström V, Rönnelid J, Charles P, Ding B, Alfredsson L, Padyukov L, Symmons DPM, Venables PJ, Klareskog L, Lundberg K. **2009**. Specific interaction between genotype, smoking and autoimmunity to citrullinated α-enolase in the etiology of rheumatoid arthritis. Nature Genetics. 41(12):1319-1326.

Maleki-Dizaji N, Eteraf-Oskouei T, Fakhrjou A, Maljaie SH, Garjani A. **2010**. The effects of 5HT3 receptor antagonist granisetron on inflammatory parameters and angiogénesis in the air-pouch model of inflammation. Int Immunopharmacol. 10:1010-1016.

Marazziti D, Ori M, Nardini M, Rossi A, Nardi I, Cassano GB. **2001**. mRNA expression of serotonin receptors of type 2C and 5A in human resting lymphocytes. Neuropsychobiology. 43:123-126.

McInnes IB, Schett G. **2011**. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. N Engl J Med. 365:2205-2219.

Mendieta-Trejo AI. **2014**. Evaluacion de los efectos de serotonina (5-HT) y melatonina (MLT) sobre la respuesta inmune antitumoral. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químico Biológicas.

Moreno RG. **2003**. Artritis reumatoide: Bases Inmunológicas para la terapia Biológica. Rev Colomb Reumatol. 10(2):119-134.

Morvan J, Berthelot j, Devauchelle-Pensec V, Jousse-Joulin S, Le Henaff-Bourhis C, Hoang S, Thorel JB, Martin A, Youinou P, Saraux A. **2009**. Changes over time in the diagnosis of rheumatoid arthritis in a 10 year cohort. J Rheumatol. 36:2428-2434.

Mossner R, Lesch KP. **1998**. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. Bran Behav Immun. 12:249-271.

Naranjo A. **2006**. ¿Qué síntomas tiene la artritis reumatoide?. En: Ballina FJ, Ed. Artritis Reumatoide: Guía de la enfermedad del paciente. Madrid, Jarpyo Editores. 16-21.

Nelson PM, Harrod JS, Lamping KG. **2012**. 5HT2A and 5HT2B Receptors Contribute to Serotonin-Induced Vascular Dysfunction in Diabetes. Exp Diabetes Res. Vol. 2012: 11 pages.

Peláez-Ballestas I, Sain LH, Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Burgos-Vargas R, Garza-Elizondo M, Rodriguez-Amado J, Goycochea-Robles MV, Madariaga M, Zamudio J, Santana N, Cardiel MH, Grupo de Estudio Epidemiologico de Enfermedades Musculo Articulares (GEEMA). Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. **2011**. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. J Rheumatol Suppl. 86:3-8.

Pai VP, Marshall AM, Hernandez LL, Buckley AR, Horseman ND. **2009.** Altered serotonin physiology in human breast cancers favors paradoxical growth and cell survival. Breast Cancer Res. 11: R81.

Paula FS, Alves JD. **2014**. Non-tumor necrosis factor-based biologic therapies for rheumatoid arthritis: present, future, and insigths into pathogenesis. Biol Targets Ther. 8:1-12.

Power D, Codd M, Ivers L, Sant S, Barry M. 1999. Prevalence of rheumatoid arthritis in Dublin, Ireland: a population based survey. Ir J Med Sci. 168:197-200.

Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BAW, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, Van Venrooij WJ. **2003**. Antibodies Against Cyclic Citrullinated Peptide and IgA Rheumatoid Factor Predict the Development of Rheumatoid Arthritis. Arthritis Rheum. 48(10):2741-2749.

Riise T, Jacobsen BK, Gran JT. **2001**. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in the country of Troms, Northern Norway. J Rheumatol. 27:1386-9.

Rodríguez-Cruz A. **2013**. Estandarización de sustrato-ECL no comercial en análisis de expresión de receptores 5-HT5A y de melatonina en linfocitos por Western Blot. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis que para obtener el grado de Químico Farmacéutico Biólogo.

Sacre S, Medghalchi M, Gregory B, Brennan F, Williams R. **2010**. Fluoxetine and Citalopram Exhibit Potent Antiinflammatory Activity in Human and Murine Models of Rheumatoid Arthritis and Inhibit Toll-like Receptors. Arthritis Rheum. 62(3):638-693.

Santibánez-Beltrán S, Villarreal-Ríos E, Galicia-Rodríguez L, Martínez-González L, Vargas-Daza ER, Ramos-López JM. **2013**. Costo económico de la polifarmacia en el adulto mayor en el primer nivel de atención. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 51(2):192-199.

Scott D, Wolfe F, Huizinga TWJ. **2010**. Rheumatoid Arthritis. Lancet. 376:1094-1108.

Senna ER, De Barros AL, Silva EO, Costa IF, Pereira LV, Ciconelli RM, Ferraz MB. **2004**. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. J Rheumatol. 31:594-59.

Shichikawa K, Inoue K, Hirota S, Maeda A, Ota H, Kimura M, Ushiyama T, Tsujimoto M. **1999**. Changes in the incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in Kamionda, Wakayam, Japan, 1965-1996. Ann Rheum Dis. 58:751-756.

Silman AJ, Ollier W, Holligan S, Birrell F, Adebajo A, Asuzu MC, Thomson W, Pepper L. **1993**. Absence of rheumatoid arthritis in a rural Nigerian population. J Rheumatol. 20:618-622.

Simonsson M, Bergman S, Jacobsson LT, Petersson IF, Svensson B. **1999**. The prevalence of rheumatoid arthritis in Sweden. Scand J Rheumatol. 28:340-343.

Spindler A, Bellomio V, Berman A, Lucero E, Baigorria M, Paz S, Garrone N, Torres AI, Romano O, Carraccio A, Leal O, Bazzano A, Vazquez D, Pera O, Arquez G, Valdez M, Lazaro H, Rengel S, Acosta E, Santana M. **2002**. Prevalence of rheumatoid arhtritis in Tucuman, Argentina. J Rheumatol. 29:1166-1170.

Stefulj J, Jernej B, Cicin-Sain L, Rinner I, Schauenstein K. **2000**. mRNA expression of serotonin receptors in cells of the immune tissues of the rat. Brain Behav Immun. 14:219-224.

Stefulj J, Jakopec S, Osmak M, Jernej B. **2002**. Serotonin and Apoptosis: Studies on Rat Lymphocytes. Neuroimmunomodulation. 10: 132-133.

Symmons D, Turner G, Webb R, Asten P, Barrett E, Lunt M, Scott D, Silman A. **2002**. The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century. Rheumatology. 41:793-800.

Szekanecz Z, Pakozdi A, Szentpetery A, Besenyei T, Koch AE. **2010**. Chemokines and angiogénesis in rheumatoid arthritis. Front Biosci (Elite Ed). 1:44-51.

Tolboom TCA, Van der Helm-Van Mil AHM, Nelissen RGHH, Breedveld FC, Toes REM, Huizinga TWJ. **2005**. Invasiveness of fibroblast-like synoviocytes is an individual patient characteristic associated with rate of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 52:1999-2002.

Tornero J. **2006**. ¿Qué es la artritis y qué tipos existen?. En: Ballina FJ, Ed. Artritis Reumatoide: Guía de la enfermedad del paciente. Madrid, Jarpyo Editores. 9-11.

Van der Linden MP, Van der Woude D, Ioan-Facsinav A, Nivine-Levarht EW, Stoeken-Rijsbergen G, Huizinga TWJ, Toes REM, Van der Helm-Van Mil AHM. **2009**. Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 60:2232-2241.

Van Oosterhout M, Bajema I, Levarht EW, Toes RE, Huizinga TWJ, Van Laar JM. **2008**. Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid rthritis. Arthritis Rheum. 58:53-60.

Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, Splitz PW, Haga M, Kleinheksel SM, Cathey MA. **1994**. The mortality of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 37:481-491.

Yin J, Albert RH, Tretiakova AP, Jameson BA. **2006**. 5-HT1B receptors play a prominent role in the proliferation of T-lymphocytes. J Neuroimmunol. 181: 68-81.

Yu B, Becnel J, Mourad Z, Rohatgi R, Boulares AH, Nichols CD. **2008**. Serotonin 5-Hydroxytryptamine2A Receptor Activation Suppresses Tumor Necrosis Factor-Induced Inflammation with Extraordinary Potency. JPET. 327:316-323.

Zhong H, SuYang H, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. **1997**. The Transcriptional Activity of NF-Kb Is Regulated by the IκB-Associated PKAc Subunit through a Cyclic AMP-Independent Mechanism. Cell. 89: 413-424.

12. ANEXOS

ANEXO I. Consentimiento Informado del paciente.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica, caracterizada por una inflamación severa, dolor articular, así como destrucción de articulaciones sinoviales y conjuntas, lo cual conduce a una discapacidad severa y mortalidad prematura. Los tratamientos con los que actualmente se cuenta, van dirigidos principalmente a resolver los signos y síntomas, restaurar la función física y prevenir el desarrollo de daño en las articulaciones, o en caso de que exista daño, para aminorar o detener la progresión de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de la disponibilidad actual de una amplia gama de fármacos y agentes biológicos (utilizados ya sea individualmente o en combinación), puede que no sea posible lograr una remisión completa, por ello la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas cada vez se hace más recurrente. Por ello le invitamos como paciente que sufre esta patología, participe en este estudio.

PROPÓSITO

El objetivo de este trabajo consiste en encontrar las bases moleculares para saber más sobre la función del receptor serotoninérgico 5-HT_{5A}, el cual se esperaría que funcione como un bloqueante en la expresión de citocinas proinflamatorias, y que en un futuro sea utilizado como un blanco farmacológico para el tratamiento de la artritis reumatoide.

PROCEDIMIENTO

El investigador y/o el representante tomaran una muestra de sangre periférica de la vena media/basílica/cefalea del brazo izquierdo o derecho. Primero se realizara un torniquete en el brazo con una ligadura para identificar las venas, se realizara una limpieza del área venosa con una torunda de algodón con alcohol, posteriormente se colocara una aguja nueva en el vacutainer, se insertara la aguja dentro de la vena y enseguida se introducirá el tubo para muestra sanguínea color morado que contiene EDTA, se retirara la ligadura y se esperara a que el tubo este lleno a un 80% de su capacidad, se retirara el vacutainer y se colocara una torunda de algodón ligeramente humedecida con alcohol en el área de la picadura y se le pedirá al paciente que mantenga doblado el brazo por unos minutos con la torunda, posteriormente podrá desechar el algodón.

EVENTOS ADVERSOS Y MOLESTIAS

El paciente no sufrirá eventos adversos durante la toma de muestra sanguínea, así como en la realización de los análisis a dichas muestras, ya que todo se realizaría bajo las medidas de asepsia pertinentes. En ocasiones pudiese presentar alguna molestia al realizar la picadura durante la toma de muestra sanguínea, así como la posibilidad de presentar un ligero moretón, sin embargo en la mayoría de los casos no deberá presentar este tipo de molestias.

BENEFICIOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

El paciente no asumirá ningún gasto de los estudios serológicos, ni de ningún otro estudio que realice el grupo investigador.

El paciente será beneficiado con la proporción de los datos de los estudios serológicos que le sean practicados a partir de su muestra sanguínea, los cuales incluyen las pruebas serológicas: Sedimentación Eritrocitaria, Proteína C Reactiva, Factor Reumatoide y Antígenos Anti-péptidos citrulinados (anti-CCP).

CONFIDENCIALIDAD

Los datos recabados en el estudio, así como los datos obtenidos a partir de los análisis realizados a las muestras sanguíneas, se manejaran bajo los criterios de confidencialidad que dictaminan las normas mexicanas.

INFORMACIÓN DEL CONTACTO

Investigador Responsable

Dra. Laura Cristina Berumen Segura e-mail: berumen@uaq.mx.

Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro.

Tel. (01 442) 192 1200 Ext. 5530

Comité de Bioética

Dra. Olga Patricia García Obregón e-mail: olga.garcia@uaq.mx

Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.

Tel. (442)192-1200 Ext: 5323, 5351

CONSENTIMIENTO INFORMADO

PARTICIPANTE

NOMBRE DEL PARTICIPANTE _____

Domicilio _____

_____ No telefónico _____

Firma del participante_____ Fecha _____

TESTIGO 1

Nombre del Testigo _____

Domicilio _____

_____ No telefónico _____

Firma del Testigo _____ Fecha _____

TESTIGO 2

Nombre del Testigo _____

Domicilio _____

_____ No telefónico _____

Firma del Testigo _____ Fecha _____

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR

Yo o mi representante hemos discutido con el participante la naturaleza y propósito del estudio, así como los posibles riesgos y beneficios de su participación. Considero que el participante ha recibido la información completa con un lenguaje comprensible y apropiado, además de haberle contestado sus dudas.

Nombre del investigador o representante _____

Firma del investigador _____

Fecha de la firma _____

CONSENTIMIENTO INFORMADO

He sido informado a mi entera satisfacción y se me ha dado la oportunidad de realizar preguntas sobre el proyecto. Recibiendo de manera satisfactoria respuestas a mis preguntas. Entiendo que mi participación es voluntaria y que tengo el derecho de no aceptar a participar en el proyecto. Entiendo el propósito del estudio a realizarse y que mis datos serán manejados con total confidencialidad. Se me ha dado una copia de este consentimiento para llevármela.

Libremente y sin ninguna presión acepto y doy mi consentimiento para participar en este estudio.

_____ _____

Nombre del participante Firma y Fecha

_____

Domicilio del participante

_____ _____

Nombre del testigo 1 Firma y Fecha

_____

Domicilio del testigo 1

_____ _____

Nombre del testigo 2 Firma y Fecha

_____

Domicilio del testigo 2

ANEXO II. Formulario de datos y resultados del paciente.

FOLIO: _____

DATOS DEL PACIENTE

Edad: _____ Sexo: _____ Peso corporal: _____ Altura: _____

Indique si usted ha presentado las siguientes situaciones en los últimos 2 meses

- Transfusiones sanguíneas SI NO
- Fuma SI NO
- Diabetes SI NO
- Tiroides SI NO
- Familiar con Artritis Reumatoide SI NO
- Infecciones SI NO
- Inflamación de las articulaciones SI NO

  Si su respuesta fue afirmativa al caso anterior indique de que tipo fue la infección y conteste lo siguiente: _____

  - Presenta rigidez matutina SI NO
  - Duración de los síntomas: Más de 6 semanas SI NO
- Usted recibe actualmente algún tratamiento/medicamento SI NO

  Si su respuesta fue afirmativa indique el tipo de tratamiento o medicamento:

  _____

El siguiente apartado será llenado por el investigador:

SEROLOGIA	Resultado	Resultado Control
Factor Reumatoide		
ACPA (anti-CCP)		
ESR(Sedimentación Eritrocitaria)		
CRP (Proteína-C reactiva)		

SEROLOGÍA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

CON ESTE FOLIO USTED RECOGERÁ SUS RESULTADOS EN UN TIEMPO DE 1 MES CON SU MEDICO, A PARTIR DE LA TOMA DE MUESTRA.

FOLIO: _____

13. APÉNDICE

5-HT	5-Hidroxitriptamina
AC	Adenilato ciclasa
ACPA	Anticuerpo anti-proteínas citrulinadas
ACR	Colegio Americano de Reumatología
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
ANOVA	Análisis de Varianza
Anti-CCP	Anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados
AP-1	Factor transcripción: proteína activadora 1
AR	Artritis reumatoide
BCL10	Linfoma de células B/leucemia 10 - proteína
BSA	Albúmina Sérica Bovina
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas
CARMA3	CARD asociada a MAGUK proteína 3
CBM	Complejo carma3-bcl10-malt1
COX-2	Ciclo oxigenasa tipo 2
CSF	Factor estimulante de colonia
CREB	Elemento de respuesta de unión a cAMP
DMARDS	Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad
ECL	Ensayo de Quimioluminiscencia
EULAR	Liga Europea contra el Reumatismo
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima
ERK ½	Quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2
FR	Factor Reumatoide
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
HRP	Enzima peroxidasa de rábano picante

IκBα	Inhibidor de Kappa beta
IKK	Complejo Iκβ quinasa
IL	Interleucina
INF-γ	Interferón-gamma
Ki	Constante de afinidad
MAGUK	Proteína asociada a la membrana guanilato quinasa
MALT1	Tejido linfoide asociado a la mucosa 1 - proteína
MMP	Metaloproteinasas de matriz
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
PADI4	Peptidil arginina deminasa de tipo IV
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer de Fosfatos Salinos
PBT	Buffer de Fosfatos Salinos con Triton
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PMA	Acetato de forbol miristato
SSRI´s	Inhibidores de la recaptura de Serotonina
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TRAF6	Factor asociado al receptor TNF