



EL SABER DE MIS HIJOS  
HARA MI GRANDEZ.A

UNIVERSIDAD DE SONORA

UNIDAD REGIONAL SUR

DIVISION DE CIENCIAS E INGENIERIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUIMICO-BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL mRNA Y  
NIVELES SOLUBLES DE TNF- $\alpha$  Y MIF EN  
ARTRITIS PSORIASICA”

TESIS PROFESIONAL  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUIMICO BIÓLOGO CLINICO

PRESENTA

*Jesús Fernando Valenzuela Moroyoqui*

NAVOJOA, SONORA

JUNIO DEL 2015

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## APROBACIÓN

Los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Jesús Fernando Valenzuela Moroyoqui**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.



---

**Dr. en C. José Francisco Muñoz Valle**

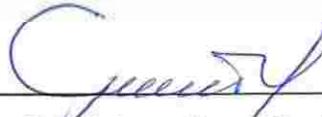
Presidente



---

**M.C. Ximena Felipe Ortega Fonseca**

Asesor



---

**Dra. Guadalupe González Ochoa**

Asesor



---

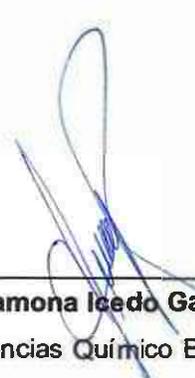
**M.C. Sarai Limón Miranda**

Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en este trabajo de tesis sin permiso especial de los autores siempre y cuando se de crédito correspondiente a los autores, a la Universidad de Sonora, Unidad Regional Sur y al Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en este trabajo de tesis, deberá dar créditos a la Universidad de Sonora, previa aprobación escrito en manuscrito en cuestión del Director de Tesis.



---

**M. C. Ramona Icedo García**

Jefa del Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias

## DEDICATORIA

Con todo mi corazón le dedico este trabajo a mis padres, Inocenta Moroyoqui Muñoz y Jesús Ernesto Valenzuela Ontiveros, por su gran apoyo y por brindarme su amor y cariño para formar en mí una persona íntegra y con valores, a quienes les debo todo y les dedico este trabajo, A mi querida hermana Luz Aracely y a mi cuñado Vicente, por apoyarme a seguir adelante.

A todos mis amigos, a los cuales quiero mucho y siempre voy a extrañar ya que con ellos hemos pasado muchos buenos y malos momentos, durante todos estos años, por su apoyo y compañía.

A Dios, por haber puesto en mi camino a personas tan valiosas, y por haberme dado vida y fuerzas para seguir adelante, ya que sin él no podría haber concluido mis estudios ni ser la persona que ahora soy.

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis realizada en la Universidad de Sonora, es un trabajo en la que participaron personas de manera directa e indirectamente, en la realización de este trabajo tuve la oportunidad de colaborar con personas quienes ofrecieron sus conocimientos y experiencia para el desarrollo de esta tesis a quienes quiero agradecer.

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis, Dr. José Francisco Muñoz Valle a quien le muestro un enorme agradecimiento, por tener confianza en mí, al otorgarme este trabajo, le agradezco su dirección y sobre todo su gran paciencia hacia mi persona.

Agradezco también, a la Universidad de Guadalajara, por abrimme las puertas de su institución, para el desarrollo del trabajo de tesis, también agradezco a miembros de esta Universidad, Q.F.B Luis Alberto Bautista Herrera, M. en C. Ulises de la Cruz Mosso y M. en C. Jorge Hernández Bello, quienes me dieron su apoyo en este proceso.

Mis agradecimientos a mi casa la Universidad de Sonora, y a todo el que labora en ella, por permitirme la formación profesional en una gran institución educativa. Agradezco a mis sinodales, Dra. Guadalupe González Ochoa, M.C Sarai Limón Miranda, por sus valiosos consejos y a mi asesora académica y de tesis la M.C. Ximena Felipe Ortega Fonseca por su entrega y dedicación para este trabajo.

## ÍNDICE

	Página
APROBACIÓN	II
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE CUADROS	XII
LISTA DE GRÁFICOS	XIII
<b>RESUMEN</b>	XIV
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	XVI
<b>HÍPOTESIS</b>	XVII
<b>OBJETIVOS</b>	XVIII
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>ANTECEDENTES</b>	2
Artritis Psoriásica	2
Criterios de clasificación de la artritis psoriásica	2
Características clínicas y de laboratorio	5
Manifestaciones clínicas de psoriasis	5
Índice de la actividad de la enfermedad (DAS28)	5
Epidemiología	6
Patogénesis	8
Factor de Necrosis Tumoral Alfa	13
Estructura	13
Localización del gen <i>TNFA</i>	13
Funciones	16
Vías de señalización	17

Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos	20
Estructura	20
Localización del gen de <i>MIF</i>	20
Funciones	23
Vías de señalización	23
Expresión de <i>TNFA</i> y <i>MIF</i> en artritis psoriásica	25
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	26
Diseño Metodológico	26
Tipo de estudio	26
Sede de estudio	26
Consideraciones éticas	26
Universo del estudio	27
Criterios de selección	27
Tamaño de muestra	27
Variables	28
Examen físico	28
Variables clínicas para los pacientes con AP	28
Pruebas de laboratorio	28
Diagrama General de la Metodología de la Evaluación	29
Análisis Molecular e Inmunológico	30
Extracción de RNA total	30
Técnica de Transcripción Inversa con <i>PrimerOligo</i> (dT)	31
PCR en Tiempo Real	33
Sondas de hidrólisis ( <i>TaqMan</i> )	
Procedimiento para la reacción de qPCR en tiempo real	36
Procedimiento para la curva de reacción de PCR en tiempo real	39
Cálculos para la curva de validación	39
Procedimiento para la cuantificación de TNF- $\alpha$ y	45

MIF soluble por ELISA (ensayo comercial, Invitrogen, USA) y ELISA (ensayo comercial, Legend Max, USA)	
Análisis Estadístico	51
Análisis descriptivo	51
Análisis interferencial	51
Pruebas no paramétricas	51
<b>RESULTADOS</b>	52
<b>DISCUSIÓN</b>	65
<b>CONCLUSIONES</b>	68
<b>ANEXOS</b>	69
<b>REFERENCIAS</b>	82

## LISTA DE ABREVIATURAS

AP	Artritis psoriásica
CASPAR	Criterio de clasificación para la artritis psoriásica ( <i>del inglés Classification of Psoriatic Arthritis</i> )
cDNA	Acido desoxirribonucleico de cadena complementario
COX2	Ciclooxigenasa 2
c-IAP2	Proteína inhibidora de apoptosis celular 2 ( <i>del inglés celular inhibitor of apoptosis protein</i> )
DAS28	Índice de actividad de la enfermedad ( <i>del inglés Disease Activity Score</i> )
DD	Dominio de muerte ( <i>del inglés Death Domain</i> )
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatados
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Fas	Moléculas adaptadoras al DD ( <i>FADD del inglés Fas-Associated Death Domian</i> )
FLICE	Proteína inhibidora ( <i>del inglés FADD-like IL-1<math>\beta</math>-converting enzyme</i> )
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa ( <i>del inglés Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase</i> )
JAB1	Proteína de unión de dominio JUN
JNK	Cinasa c-jun N-terminal ( <i>del inglés, c-jun N-terminal kinase</i> )
kDa	Kilodaltons
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad ( <i>del inglés Mayor</i> )

*Histocompatibility Complex)*

MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos ( <i>del inglés Macrophage Migration Inhibitory Factor</i> )
MMLV-RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Transcriptasa reversa</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NaCl	Cloruro de sodio
pCr	Proteína C Reactiva
PGE2	Prostaglandina E2
PLA2	Fosfolipasa 2
p38MAP	Proteína cinasa activada por mitógenos ( <i>del inglés mitogen-activated protein kinase</i> )
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa ( <i>del inglés, quantitative polymerase chain reaction</i> )
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa
SODD	Proteína silenciador de DD ( <i>del inglés Silencer of DD</i> )
TACE	Enzima convertidora de TNF- $\alpha$ ( <i>del inglés TNF-alpha converting enzyme</i> )
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta ( <i>del inglés transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa ( <i>del inglés tumor necrosis factor</i> )
TNF-RI y TNF-RII	Receptores de TNF- $\alpha$ ( <i>del inglés tumor of necrosis factor receptor</i> )
TRADDs	Proteínas adaptadoras de DD ( <i>del inglés TNF receptor-associated death domain</i> )
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Psoriasis y artritis psoriásica	3
2	Vías de señalización de la patogénesis de la AP	11
3	Vías de señalización en las articulaciones de la patogénesis de la AP	12
4	Estructura tridimensional de TNF- $\alpha$	14
5	Localización del gen de <i>TNFA</i>	15
6	Vías de señalización de TNF- $\alpha$ por medio de sus receptores TNFR-1 y TNFR-2	19
7	Estructura tridimensional de MIF	21
8	Estructura del gen de <i>MIF</i>	22
9	Vías de señalización de MIF	24
10	Sondas e iniciadores del gen <i>TNFA</i>	34
11	Sondas e iniciadores del gen <i>MIF</i>	35
12	Curva de validación de <i>TNFA</i> método $2^{-\Delta\Delta Cq}$	42
13	Curva de validación de <i>MIF</i> método $2^{-\Delta\Delta Cq}$	44
14	Procedimiento de la técnica de ELISA para TNF- $\alpha$	47
15	Procedimiento para la curva de calibración para ELISA de MIF	48
16	Procedimiento de la técnica de ELISA para MIF	50
17	Niveles solubles de TNF- $\alpha$ y MIF en pacientes con AP y SC	52
18	Representación de la asociación de DAS28 con TNF- $\alpha$ soluble	64

## LISTA DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1	Criterios de clasificación CASPAR	4
2	Prevalencia de artritis psoriásica	7
3	Criterios de selección	27
4	Condiciones de reacción para transcripción reversa	32
5	Condiciones de reacción para qPCR de <i>TNFA</i>	37
6	Condiciones de reacción para qPCR de <i>MIF</i>	37
7	Condiciones de reacción para qPCR de <i>GAPDH</i>	38
8	Diluciones de qPCR para generar la curva de validación de <i>TNFA</i> del método $2^{-\Delta\Delta Cq}$	41
9	Diluciones de qPCR para generar la curva de validación de <i>MIF</i> del método $2^{-\Delta\Delta Cq}$	43
10	Características clínicas y demográficas de los pacientes con AP	53
11	Coefficiente de correlación	63
12	Escala análoga visual	69

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO		PÁGINA
1	Expresión del mRNA de <i>TNFA</i> y <i>MIF</i> en pacientes con AP y el grupo SC	54
2	Expresión del mRNA de <i>TNFA</i> y <i>MIF</i> en relación al género	55
3	Expresión del mRNA de <i>TNFA</i> y <i>MIF</i> en relación al hábito de fumar	56
4	Expresión del mRNA de <i>TNFA</i> y <i>MIF</i> agrupados en $\leq$ 5 años y $>$ 5 años de evolución de AP	56
5	Expresión del mRNA de <i>TNFA</i> y <i>MIF</i> agrupados en $\leq$ 10 años y $>$ 10 años de evolución de la psoriasis	57
6	Expresión del mRNA de <i>TNFA</i> y <i>MIF</i> en relación al índice de actividad DAS28	58
7	Expresión del mRNA de <i>TNFA</i> y <i>MIF</i> en relación al porcentaje de afectación de la piel	58
8	Expresión del mRNA de <i>TNFA</i> y <i>MIF</i> con diferentes grados de afección ungueal en pacientes con AP	59
9	Relación de niveles solubles de $TNF-\alpha$ y la expresión del mRNA de <i>TNFA</i> y <i>MIF</i> en pacientes con AP	60
10	Relación de niveles solubles de <i>MIF</i> y la expresión del mRNA de <i>TNFA</i> y <i>MIF</i> en pacientes con AP	61

## RESUMEN

La artritis psoriásica (AP) es una enfermedad autoinmune, crónica, asociada con psoriasis. Se caracteriza por producir lesiones dérmicas hiperproliferativas con paraqueratosis, lesiones ungueales e inflamación articular. Entre algunas de las citocinas que tienen un papel importante en el desarrollo y progresión de la AP, están el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF).

El Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ), es una citocina pleiotrópica y proinflamatoria, la cual es secretada principalmente por células del sistema inmunológico, como monocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK y linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Otras células pueden producirlo como respuesta a un estímulo, tales como astrocitos, microglía, miocitos y fibroblastos.

Por su parte el Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) es una citocina secretada por células T activadas y macrófagos. Su función se asocia primordialmente con la contra-regulación de la acción inmunosupresora de los glucocorticoides, activación de macrófagos, inducción de fagocitosis. Así mismo, promueve la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 entre otras citocinas. Debido a lo anterior, el presente trabajo de investigación se enfocó en el análisis de la expresión del mRNA de *TNFA* y *MIF* con los niveles solubles de TNF- $\alpha$  y MIF (sTNF- $\alpha$  y sMIF) en pacientes con AP y sujetos control (SC). Para la determinación de la expresión relativa se utilizó la técnica de qPCR en tiempo real y para los niveles solubles el método de ELISA.

En el análisis de resultados se observó que *TNFA* incrementó su expresión 138.16 veces con respecto a los niveles de expresión de este gen en los SC, mientras que los niveles de mRNA de *MIF*, en SC se mostraron elevados 0.14 veces con respecto a los pacientes con AP. Así mismo, los niveles de

sTNF- $\alpha$  y sMIF en individuos con AP fueron de 24.61 pg/mL (20.82-28.94) y de 7.71 ng/mL (6.55-9.41), respectivamente.

En este trabajo solo los niveles de expresión de *TNFA* mostraron una diferencia marginal ( $p= 0.05$ ) con respecto al mismo ensayo en SC.

En este trabajo se observó un aumento de la expresión de *TNFA* en concordancia con la cuantificación por ELISA de los niveles solubles en pacientes con AP. Sin embargo, el comportamiento para MIF fue distinto, debido a que la expresión en SC fue mayor que en pacientes con AP. Estos datos sugieren que TNF- $\alpha$  tiene un papel preponderante en AP, y se requieren estudios longitudinales para evaluar la participación de MIF en AP.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La AP es una enfermedad autoinmune y crónica, que afecta al sistema músculo esquelético, se asocia con psoriasis y puede causar daño en cartílago y articulaciones, provocando una discapacidad funcional y reducción de la calidad de vida. MIF es un potente regulador que induce la activación de células del sistema inmune y promueve la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , el cual es considerado el principal iniciador de daño al endotelio vascular y finalmente de órganos.

Se han reportado niveles altos del RNA mensajero de *TNFA* en tejido sinovial de pacientes con AP por RT-PCR y se ha descrito la expresión de TNF- $\alpha$  en la sinovia de pacientes con AP por inmunohistoquímica. Sin embargo, hasta la actualidad no se ha descrito la expresión del mRNA de *MIF* en AP, siendo esta una citocina relevante que se ha reportado se produce *upstream* de TNF- $\alpha$ .

Con base a lo anterior, fue de nuestro interés analizar la expresión del mRNA de *TNFA* y *MIF*, así como los niveles solubles en AP.

## HIPÓTESIS

Los pacientes con AP presentan niveles elevados de mRNA de *TNFA* y *MIF* lo que se asocia con los altos niveles de TNF- $\alpha$  y MIF solubles.

## OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de mRNA de *TNFA* y *MIF* con los niveles solubles de  $\text{TNF-}\alpha$  y MIF en pacientes con artritis psoriásica.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar los niveles de expresión de mRNA de *TNFA* y *MIF* en pacientes con AP y SC
2. Cuantificar los niveles solubles de  $\text{TNF-}\alpha$  y MIF en pacientes con AP y SC
3. Asociar los niveles del mRNA de *TNFA* y *MIF*, con los niveles solubles de  $\text{TNF-}\alpha$  y MIF en pacientes con AP y SC
4. Asociar los niveles de expresión de mRNA de *TNFA* y *MIF*, y así como los niveles solubles con las características clínicas de AP

## INTRODUCCION

La artritis psoriásica (AP) es una enfermedad autoinmune, crónica, que afecta al sistema músculo esquelético y se asocia con psoriasis, se caracteriza por ser seronegativa para el factor reumatoide. Además, puede producir daño en el cartílago y articulaciones, con la consiguiente discapacidad funcional y reducción de la calidad de vida.

La etiología de la AP aún es desconocida, sin embargo hay elementos genéticos, inmunológicos y ambientales que desempeñan un papel importante en el proceso inflamatorio. En estudios genéticos se ha observado que existen genes asociados a la patogénesis de la AP y la principal asociación genética es en la región del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I, en el alelo HLA-Cw\*0602. Sin embargo, se han descrito otras asociaciones de genes de la región MHC. En otros estudios se ha sugerido que polimorfismos en los genes de *TNFA* y *MIF* predisponen al paciente o aumenta la susceptibilidad de enfermedades autoinmunes tales como la AP.

Por otro lado, existen otros factores que influyen en el desarrollo de la AP, tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) e infección por *Streptococcus sp.* También se asocia la ingesta de alcohol y tabaquismo con esta enfermedad.

En AP, la patología de la piel y lesiones articulares pertenecen a una reacción inflamatoria, la naturaleza de estas lesiones se demuestra por hiperplasia de las células del revestimiento sinovial y la infiltración de mononucleares y polimorfonucleares. Además, las citocinas tienen un papel importante en la AP tales como  $TNF-\alpha$  y MIF, ya que se encargan de la activación de células del sistema inmune y promueven la secreción de otra citocinas proinflamatorias.

activación de células del sistema inmune y promueven la secreción de otras citocinas proinflamatorias.

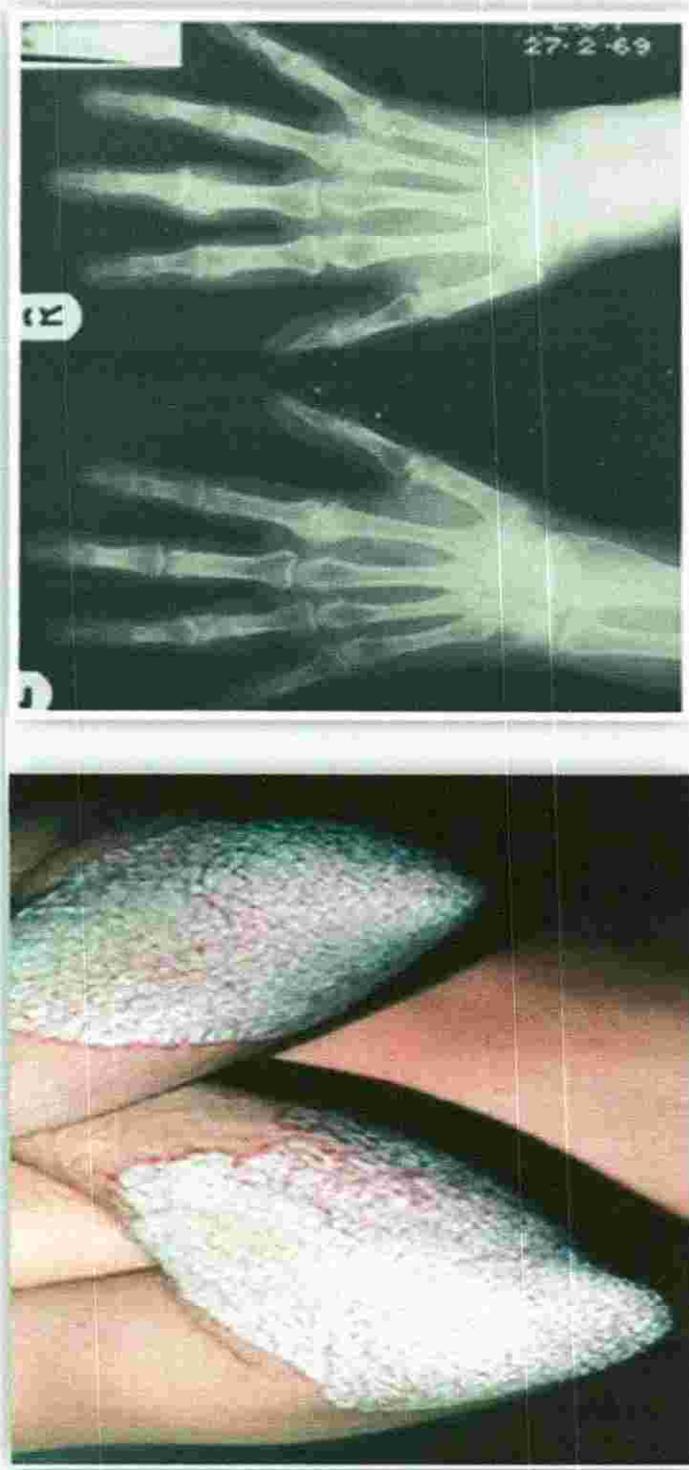
## **ANTECEDENTES**

### Artritis Psoriásica

La artritis psoriásica (AP) es una enfermedad autoinmune, crónica, que afecta al sistema músculo esquelético, se asocia con psoriasis, enfermedad inflamatoria de la piel (Wang, 2013). La AP, puede producir daño en el cartílago y articulaciones, con la consiguiente discapacidad funcional y reducción de la calidad de vida (Firestein et al 2012, Juan D. 2011). Usualmente es seronegativa para el factor reumatoide y está clasificada dentro de las espondiloartropatías seronegativas (Moll y Wright, 1973). La AP se caracteriza por presentar lesiones dérmicas hiperproliferativas con paraqueratosis, lesiones ungueales e inflamación articular que puede tener 5 formas clínicas entre las que se encuentran: (1) afectación de las articulaciones interfalángicas distales, (2) artritis mutilante, (3) poliartritis simétrica indistinguible de artritis reumatoide, (4) oligoartritis asimétrica (Figura 1) y (5) espondiloartropatía (Sankowski, 2013).

### **Criterios de clasificación de la artritis psoriásica**

El criterio de clasificación de la AP está basado en una combinación de manifestaciones clínicas típicas de la enfermedad, exámenes de laboratorio y radiográficos. El criterio de clasificación para la artritis psoriásica más utilizado en la actualidad es el CASPAR (del inglés *Classification of Psoriatic ARthritis*) publicado en 2006, por su alta sensibilidad y especificidad con 91.4% y 98.7%, respectivamente [Cuadro 1] (Taylor et al., 2006).



A)  
B)

**Figura 1. Psoriasis y artritis psoriásica. A) Psoriasis en placa caracteriza por parches de piel inflamada con escamas plateadas en codos. B) Radiografía de asimetría típica implicando algunas articulaciones (Modificado de Moll, 1973 y Roberson, 2010).**

**Cuadro 1. Criterios de clasificación CASPAR (Modificado de Taylor, 2006)**

<b>CASPAR</b>
Para ser clasificado con AP, un paciente debe tener la enfermedad articular inflamatoria con 3 puntos de las siguientes 5 categorías:
1. Evidencia de psoriasis actual, un historial de psoriasis personal un historial familiar de psoriasis.
2. Distrofia ungueal típica psoriásica incluyendo onicólisis, puntilleo, e hiperqueratosis
3. Un resultado negativo de la prueba de la presencia de factor reumatoide por cualquier método excepto el látex pero preferiblemente mediante un ensayo o nefelometría inmunoenzimático, de acuerdo con los valores de referencia del laboratorio local
4. Dactilitis
5. Evidencia radiográfica de la formación de hueso nuevo yuxtaarticular, apareciendo como osificación mal definida cerca de márgenes de la articulación (pero excluyendo la formación de osteofitos) en las radiografías simples de la mano o el pie.

## **Características clínicas y de laboratorio**

Moll y Wright, distinguieron 5 formas clínicas de AP:

1. Curso clásico de la enfermedad con el compromiso de articulaciones interfalángicas distales (5% de los casos)
2. Artritis mutilante (5% de los casos)
3. Poliartritis simétrica indistinguible de artritis reumatoide con factor reumatoide negativo (15% de los casos)
4. Oligoartritis asimétrica, con compromiso de articulaciones interfalángicas distales y metacarpofalángicas (70% de los casos)
5. Espondiloartropatía (5% de los casos) (Sankowski et al., 2013)

## **Manifestaciones clínicas de psoriasis**

La psoriasis es una enfermedad crónica de la piel, que se asocia con manifestaciones dermatológicas sistémicas. Estas se presentan como placas eritematosas y escamosas, así como pápulas y placas rojas cubiertas con escamas plateadas, los sitios más comunes son en los codos, rodillas, el cuero cabelludo y la zona lumbar (Weigle, 2013; Boehnckey, 2014).

La mayoría de los pacientes con AP presentan lesiones epidérmicas con el mismo patrón de la psoriasis vulgar, pustular y eritrodérmica. Además, los pacientes con AP presentan lesiones ungueales como onicólisis y puntillero (Firestein et al., 2012).

## **Índice de Actividad de la Enfermedad (DAS28)**

Existen varios criterios que se han usado para evaluar la actividad de la enfermedad en pacientes con AP. Sin embargo, ninguno de ellos está validado en la práctica clínica. Actualmente, el índice más utilizado para la

evaluación de la actividad clínica de la AP es el DAS28 (*del inglés Disease Activity Score*), porque evalúa efectivamente la afectación articular periférica, el dolor y la función (Anexo 1) (FitzGerald et al., 2012).

Se considera al DAS28 como la mejor opción para valorar la AP en la práctica clínica. Aunque este criterio no evalúa articulaciones que son importantes en la AP como las articulaciones interfalángicas distales de manos y de los pies, su importancia resulta por su demostración como mejor índice en ensayos clínicos, aunado a la falta de criterios específicos para la AP y la familiaridad en su uso por los reumatólogos para la valoración de esta enfermedad (Collantes et al., 2007).

### **Epidemiología**

Existen pocos estudios de prevalencia en AP, sin embargo se han reportado estudios en diferentes países, una prevalencia que va en un rango de 0.06% al 0.2% (Cuadro 2). Se ha observado que factores raciales y étnicos influyen en la prevalencia de la AP en estudios de epidemiología en varias poblaciones; sin embargo, siguen siendo limitados los datos disponibles y la ausencia de una definición de caso estándar para artritis psoriásica para estudios de población y su relativa rareza han contribuido a la escasez general de los datos disponibles (Setty y Choi, 2007).

**Cuadro 2. Prevalencia de artritis psoriásica.** Porcentaje de prevalencia en estudios de diferentes países (Modificado de Setty y Choi, 2007).

Estudios	País	Años	Prevalencia, (%)
Lomholt	Islas Faroe	1963	0.04
Hellgren	Suecia	1969	0.02
Van Romunde <i>et al.</i>	Holanda	1984	0.05
Shbeeb <i>et al.</i>	USA(Olmsted County)	2000	0.1
Alamanos <i>et al.</i>	Grecia	2003	0.06
Trontzas <i>et al.</i>	Grecia	2005	0.17
Madland <i>et al.</i>	Noruega	2005	0.2
Gelfand <i>et al.</i>	USA	2005	0.25

## **Patogénesis**

La etiología de la AP aún es desconocida, sin embargo hay elementos genéticos, inmunológicos y ambientales que desempeñan un papel importante en el proceso inflamatorio (Nogales et al., 2010).

**Factores genéticos.** En estudios genéticos se ha observado que existen genes asociados a la patogénesis de la AP y la principal asociación genética es en la región del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I, en el alelo HLA-Cw\*0602 (Nogales et al., 2010; Veale et al., 2005). La función de estas moléculas es la presentación de péptidos derivados de las proteínas del citoplasma a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Esto sugiere que el papel de HLA-Cw\*0602 en la patogenia de la enfermedad es la presentación de un auto-antígeno citoplasmático presente en las células de la piel o la sinovia a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> autorreactivos (González et al., 2012; P Rahman,2005).

En otros estudios se asocia la enfermedad con el alelo HLA-B, como el HLA-B38, HLA-B39 y HLA-B27, este último se identificó asociado principalmente en pacientes con espondilitis anquilosante y con en el desarrollo de la psoriasis (Reveille, 2012). Por otro lado, se han examinado otras asociaciones de genes de la región MHC. Estudios previos han sugerido que polimorfismos en el gen de *TNFA* predisponen al paciente o aumenta la susceptibilidad de enfermedades autoinmunes tales como la AP (Veale et al., 2005).

En los últimos años, diversos estudios han vinculado a polimorfismos del gen *MIF* (del inglés *Macrophage Migration Inhibitory Factor*), con susceptibilidad o severidad en enfermedades autoinmunes, como la psoriasis en la que se observa un incremento en los niveles de MIF (Denkinger et al., 2004; Renner et al., 2005).

**Factores ambientales.** Aún no se conoce el componente ambiental que desencadena el desarrollo de la AP, sin embargo existen algunos factores que se han observado que influyen en individuos genéticamente predispuestos, tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) e infección por *Streptococcus sp.* Además, algunos estudios han reportado la aparición de la artritis después de un trauma físico en los pacientes con psoriasis. También se le asocia con la ingesta de alcohol y tabaquismo (Eder et al., 2011; Firestein et al., 2012; González et al., 2012)

**Fisiopatología.** En AP, la patología de la piel y lesiones articulares pertenecen a una reacción inflamatoria, la naturaleza de estas lesiones se demuestra por hiperplasia de las células del revestimiento sinovial y la infiltración de mononucleares y polimorfonucleares. Se han encontrado células dendríticas en el líquido sinovial de pacientes con AP que presentan antígenos a linfocitos T CD4<sup>+</sup> dentro de las articulaciones y la piel lo cual conduce a la activación de linfocitos T. Los fibroblastos de la piel y sinovia de pacientes con AP tienen un aumento de la actividad proliferativa y la capacidad para secretar grandes cantidades de IL-1 $\beta$ , IL-6, y factor de crecimiento derivado de plaquetas [*del inglés Platelet Derivated Growth Factor*] (Firestein et al., 2012).

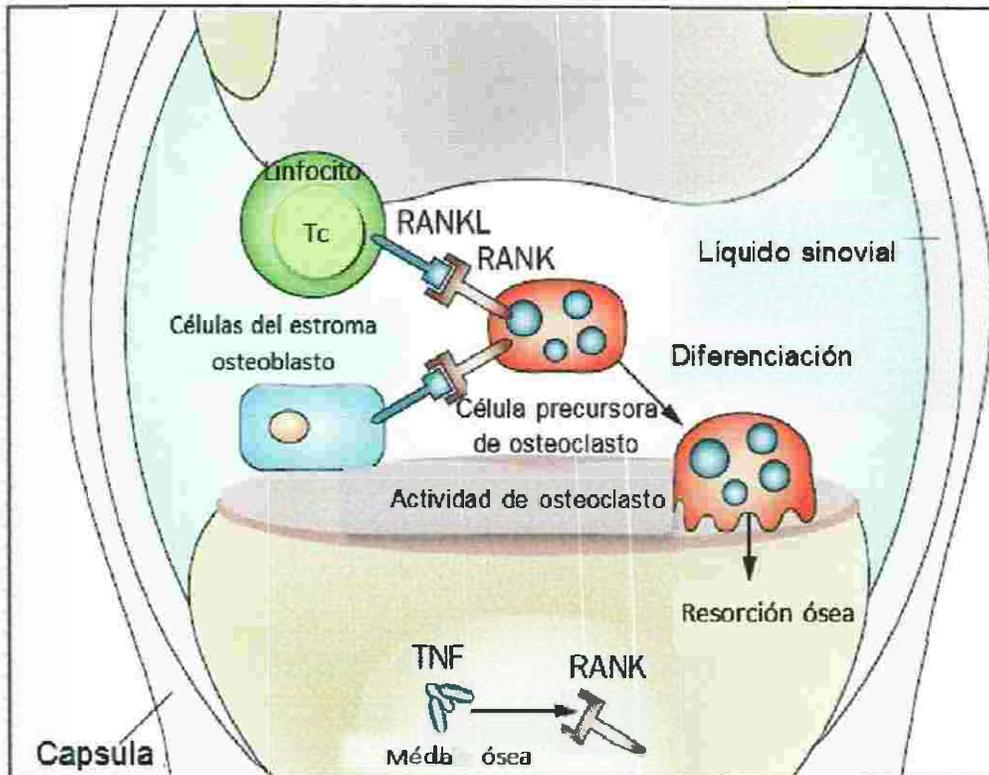
Los macrófagos desempeñan un papel importante en la patogénesis de la AP ya que son responsables de la producción de la metaloproteinasa-2 y metaloproteinasa-9, las cuales se han demostrado que están incrementadas en AP y se correlacionan con una mayor vascularización. A través de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-6 se regula la erosión del cartílago en artritis inflamatorias (Firestein et al., 2012).

Las citocinas tienen un papel importante en la patogénesis de la AP, como el perfil Th1, incluyendo: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, así como el perfil Th17: IL-17A e IL-17F (Eder et al., 2011). TNF- $\alpha$  participa en la patogenia de la enfermedad,

esta citocina es sintetizada principalmente por los macrófagos y su función principal es inducir la inflamación [Figura 2] (González et al., 2012). En otros estudios se ha demostrado que TNF- $\alpha$  regula el aumento de la expresión endotelial y de queratinocitos en las placas psoriásicas, también desempeña un papel importante en la adhesión y el tráfico celular, además de promover la infiltración de linfocitos T (Veale et al., 2005) [Figura 2]. También TNF- $\alpha$  estimula la producción de RANKL promoviendo la resorción ósea estimulando la actividad de los osteoclastos (U. Islander et al, 2011) [Figura 3]. El aumento de las concentraciones de TNF- $\alpha$  han sido detectados en lesiones psoriásicas de la piel y en los fluidos sinoviales de pacientes con AP. Por lo tanto, TNF- $\alpha$  es una citocina involucrada en la patogenia de la psoriasis mediante la activación de los linfocitos T y macrófagos.

Otra de las citocinas que participan en la patogenia de la AP es MIF, de la cual se han observado altos niveles en psoriasis y otras enfermedades autoinmunes, y que además promueve la producción de una gran variedad de citocinas proinflamatorias tales como TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6, entre otras y la activación de macrófagos (Calandra y Roger, 2003; Denkinger et al., 2004)





**Figura 3. Vías de señalización en las articulaciones de la patogénesis de la AP** (Modificado de O’Rielly, 2011).

### **Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )**

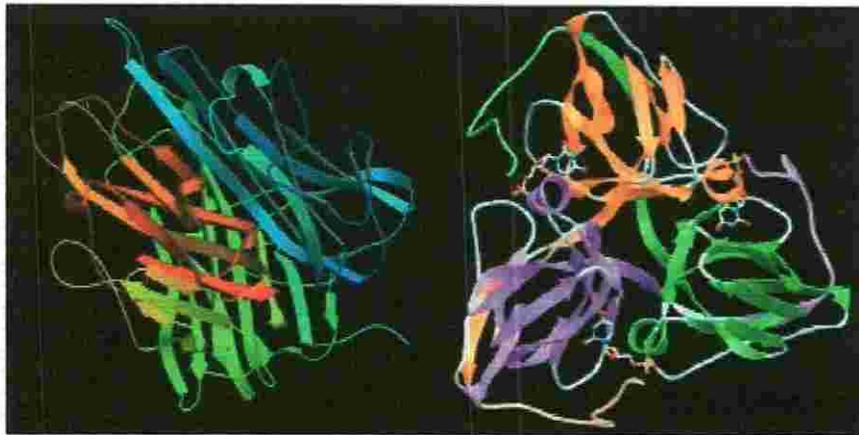
TNF- $\alpha$ , es una citocina pleiotrópica, proinflamatoria que pertenece a la superfamilia de mediadores que llevan su nombre y a la cual pertenecen al menos 15 citocinas, está expresada principalmente en la membrana celular y participan en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis. TNF- $\alpha$ , es secretada principalmente por células del sistema inmune, como los monocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK y linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Otras células pueden producirlo como respuesta a un estímulo, tales como astrocitos, microglia, miocitos y fibroblastos (Krueger y Callis, 2004; MacEwan, 2002).

#### **Estructura**

El TNF- $\alpha$  es sintetizada como una proteína de membrana de 26 kDa con 233 aminoácidos, la cual sufre cortes proteolíticos a nivel de residuo 76 por la enzima convertidora de TNF- $\alpha$  (TACE, del inglés *TNF-alpha converting enzyme*) para dar lugar a la forma soluble conformado por 157 aminoácidos y de 17 kDa. En estudios cristalográficos se muestra que el TNF- $\alpha$  está formado por tres monómeros asociados de manera no covalente y cuyo extremo N-terminal se encuentra expuesto en la superficie [Figura 4] (MacEwan, 2002).

#### **Localización del gen *TNFA***

El gen *TNFA* se encuentra ubicado en el *locus* 6p21.31, dentro de la región del MHC clase III, entre los genes HLA-B y el del factor C del Complemento (Figura 5). El gen *TNFA* tiene un tamaño de 3.6 Kb y está conformado por cuatro exones; el primero se encarga de codificar una proteína precursora de 233 aminoácidos, mientras que los tres restantes codifican para cada uno de los monómeros que conforman la proteína activa (MacEwan, 2002)



**Figura 4. Estructura tridimensional de TNF- $\alpha$**  (Modificado de J. De Los Ríos, 2009).

---

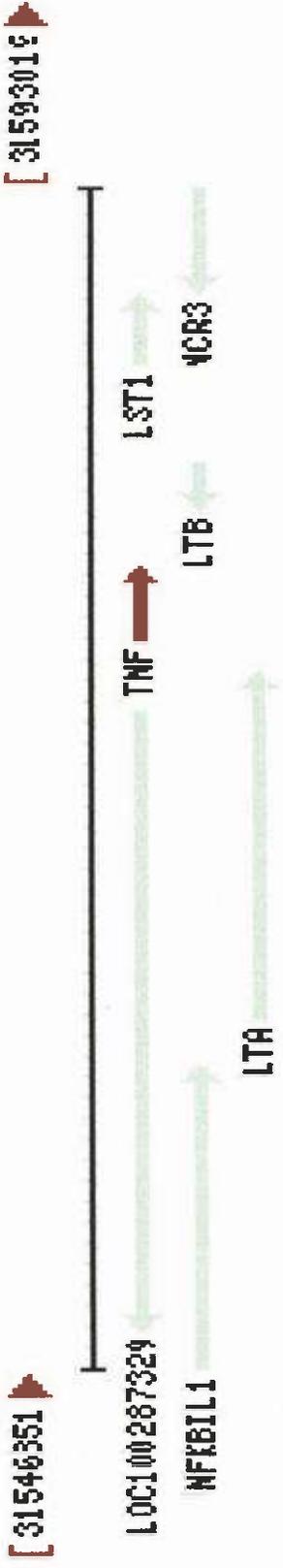


Figura 5. Localización del gen de TNFA, modificado de HGNC Database, HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC).

## Funciones

TNF- $\alpha$  regula diversos eventos biológicos fundamentales de las células, tales como la activación de los leucocitos, liberación de diversas citocinas y quimiocinas. Normalmente esta citocina puede actuar sobre diferentes tejidos, como el endotelio vascular, el sistema nervioso central, hígado, pulmón, tejido muscular, sistema cardiovascular, adipocitos, y asimismo generar efectos sobre el sistema endocrino, hematopoyético además de intervenir en la apoptosis (Fragoso et al., 2013)

A nivel del endotelio vascular, el TNF- $\alpha$  presenta una actividad procoagulante que estimula la expresión de factores tisulares y suprime cofactores importantes para la actividad de la proteína C anticoagulante. Además, el TNF- $\alpha$  activa células endoteliales para que produzcan IL-1; asimismo, puede inducir la expresión de moléculas HLA-A, B y activa antígenos que participan en la adherencia de leucocitos y plaquetas a la superficie del endotelio. La acción del TNF- $\alpha$  a nivel vascular causa una serie de manifestaciones de toxicidad, generando coagulación difusa, necrosis de órganos vitales, deshidratación y falla pulmonar (Anaya, 2003).

Por otra parte, el TNF- $\alpha$  regula la expresión de proteínas de fase aguda en los hepatocitos, generando un incremento de estas proteínas en el suero y suprimiendo la síntesis de albúmina (Anaya, 2003).

Al igual que la IL-1, el TNF- $\alpha$  es un poderoso inductor de respuesta inflamatoria. Así, TNF- $\alpha$  puede inducir la producción de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL4, IL-6, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  (del inglés *transforming and growth factor  $\beta$* ), MIF, entre otros (Anaya, 2003).

## Vías de señalización

TNF- $\alpha$  señala a través de dos receptores TNF-R1 y TNF-RII (del inglés *tumor of necrosis factor receptor*) en diversas células del sistema inmunológico [Figura 6] (Krueger y Callis, 2004). Estos dos receptores son estructuralmente diferentes, denominados receptor tipo I (TNF-R1; p55 o p60) y el receptor tipo II (TNF-RII; p80 o p75). Ambos receptores son glicoproteínas transmembranales y forman parte de los 21 miembros de la familia de receptores TNF- $\alpha$ . Los dos receptores de TNF- $\alpha$  están presentes en todos los tipos de células, excepto en eritrocitos. La distribución del TNF-R1 es mucho más amplia que la del TNF-RII y la unión al TNF-R1 es irreversible, mientras que la unión al TNFRII presenta una asociación muy baja y una cinética rápida (Anaya, 2003; MacEwan, 2002).

TNF-R1 contiene una región de 80 aminoácidos conocido como dominio de muerte (DD, del inglés *Death Domain*) se encuentra presente en proteínas asociadas que relacionan moléculas que son primeramente involucradas en la señalización de muerte celular. La proteína SODD (del inglés *Silencer of DD*) se une a la región DD del TNFR-I y previene la interacción de otras proteínas con el DD. El TNFR-I y II contienen secuencias capaces de asociarse a proteínas adaptadoras intracelulares las cuales se unen al receptor para la activación de varias vías de señalización (MacEwan, 2002) .

Las proteínas TRADDs (del inglés *TNF receptor-associated death domain*), son proteínas adaptadoras citosólicas de 34 kDa que se ligan directamente a TNFR-I con su secuencia DD. La proteína TRADD recluta moléculas adaptadoras de la señalización asociados al dominio de muerte Fas (*FADD del inglés Fas-Associated Death Domain*). FADD contiene una secuencia de dominio de muerte efectora (*DED del inglés Death Effector Domain*) que interacciona con el dominio DED de la caspasa-8 y otras moléculas que

contienen el dominio DED que regulan los mecanismos de muerte celular (Anaya, 2003, MacEwan, 2002).

Uno de los genes bajo el control del factor transcripcional de NF- $\kappa$ B es la proteína inhibidora de apoptosis celular 2 (c-IAP2 del inglés *celular inhibitor of apoptosis protein*) que liga a TRAF2 y es capaz de bloquear la activación de caspasa-8 y la apoptosis. Del mismo modo A20 liga a TRAF2 y es anti-apoptótica (Anaya, 2003, MacEwan, 2002).

La cinasa estimuladora de apoptosis (ASK1, del inglés *apoptosis-stimulating kinase*) ha sido implicada en la activación de p38MAP (del inglés *mitogen-activated protein kinase*) y la cinasa c-jun del extremo terminal N-terminal (JNK, del inglés *c-jun N-terminal kinase*) así como de los factores de transcripción tales como AP-1 y NF- $\kappa$ B (Anaya, 2003, MacEwan, 2002).

Otra proteína recientemente identificada que interactúa con FADD por su dominio DED es la proteína inhibidora FLICE (del inglés *FADD-like IL-1 $\beta$ -converting enzyme*). Algunos estudios sugieren el papel crucial de las caspasas -3, -8 y -10 en la inducción de TNF- $\alpha$  en mecanismos apoptóticos (MacEwan, 2002).

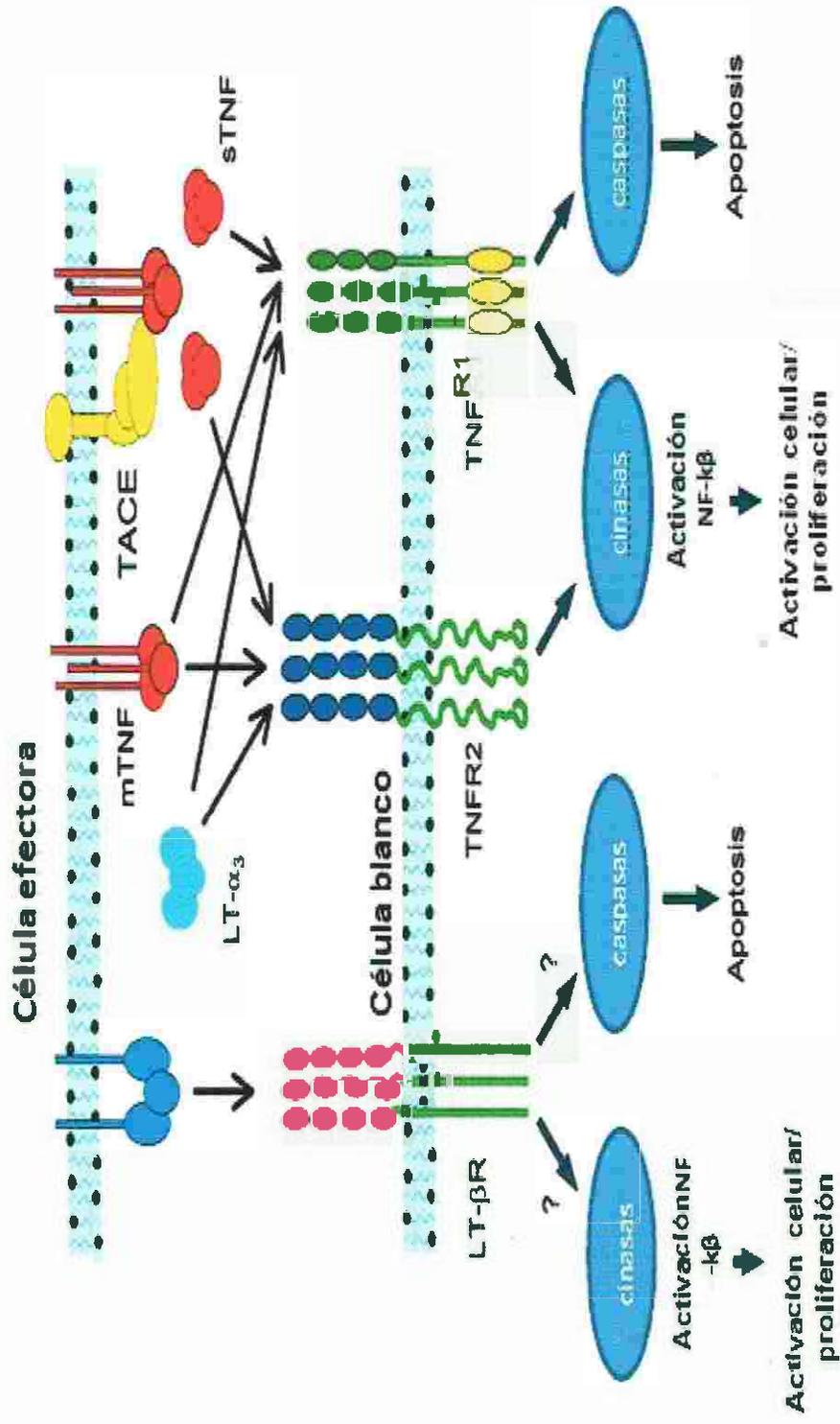


Figura 6. Vías de señalización de TNF-α por medio de sus receptores TNFR-1 y TNFR-2 (Modificado de Probert, 2000).

### **Factor Inhibidor de Migración de Macrófagos (MIF)**

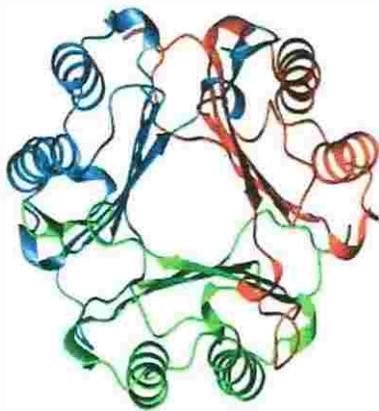
Es una citocina cuyas acciones principales incluyen contra-regulación de la acción inmunosupresora de los glucocorticoides y la inhibición de la activación inducida por apoptosis, la activación de macrófagos, la inducción de la fagocitosis, promotor de la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL6 entre otras. MIF es secretada por macrófagos y células T activadas. Por otra parte se ha demostrado que células dendríticas, células B, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y basófilos, pueden expresar MIF, así como de las células de la glándula pituitaria y sinoviocitos (Calandra y Roger, 2003; Donn et al., 2004; Llamas-Covarrubias et al., 2013).

#### **Estructura**

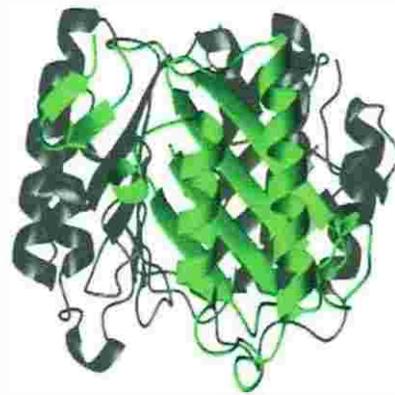
MIF consiste en 115 aminoácidos combinados en una única estructura con un peso molecular 12.5 kDa, en cristalografía se ha demostrado que MIF es un homotrímero de subunidades idénticas [Figura 7] (Denkinger et al 2004, Donn et al 2004).

#### **Localización del gen de *MIF***

El gen *MIF* es localizado en el cromosoma 22 (22q11.2). El gen *MIF* en humanos se compone de tres exones cortos de 107, 172 y 66 pares de bases, y dos intrones de 188 y 94 pares de bases [Figura 8] (Calandra y Roger, 2003; Eder et al., 2011).



Vista superior de MIF



Vista lateral de MIF

**Figura 7. Estructura tridimensional de MIF (Modificado de Calandra, 2003).**

---

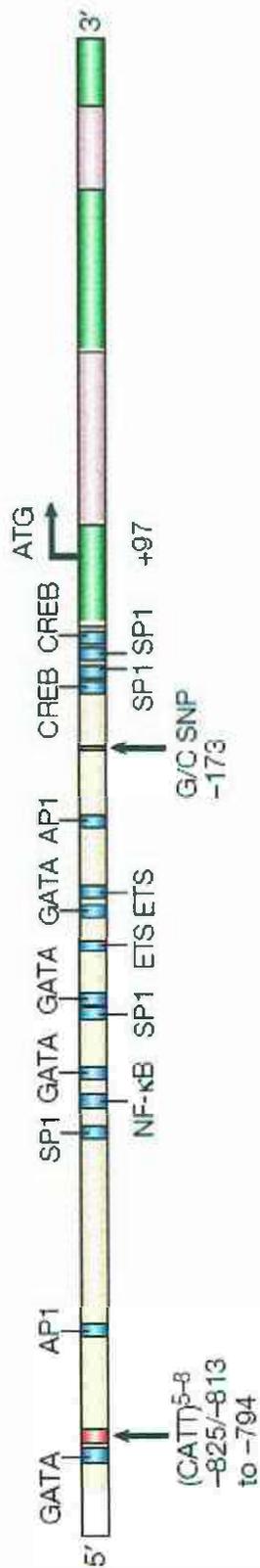


Figura 8. Estructura del gen de *MIF* (Modificado de Calandra, 2003).

## **Funciones**

MIF es una citocina que tiene varias funciones, entre las que se encuentran promover la producción y expresión de citocinas proinflamatorias tales como: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, entre otras como moléculas de adhesión y metaloproteinasas de matriz; inhibición de la activación por apoptosis, favorece la activación y proliferación de macrófagos y linfocitos T, además es un contra-regulador de la acción inmunosupresora de los glucocorticoides (Calandra, 2003, Larson, 2006).

## **Vías de Señalización**

Varios estudios sugieren una interacción de MIF con los receptores de superficie de las células blanco, pero hasta ahora se ha identificado que MIF interactúa con CD74 con una alta afinidad de unión. Una vez unida a CD74, MIF induce la activación de la proteína cinasa ERK-1/ ERK2 y se asocia con el aumento de la actividad enzimática de la fosfolipasa citoplasmática A2 (PLA2) en CD74. MIF también interviene en la señalización de la respuesta ante la invasión de bacterias mediante el complejo receptor TLR4-LPS. Por otra parte, MIF puede participar en la inhibición de la señalización de apoptosis suprimiendo la actividad de p53 la cual requiere la activación de la serie ERK1/ERK2, PLA2, ciclooxigenasa 2 (COX2) y PGE2 (Calandra y Roger, 2003; Leng et al., 2003)

Se ha demostrado que MIF interactúa con la activación de la proteína de unión de dominio JUN 1 (JAB1); JAB 1 activa a la cinasa JUN N-terminal (JNK) para fosforilar a JUN que funciona como un co-activador de la proteína activadora AP1 el cual es un factor de transcripción que está implicado en el crecimiento celular, la transformación y la muerte celular. La endocitosis de MIF a la célula, implican endosomas que participan en la traducción de la señal que está mediada por los receptores de citocinas activados por ligando [Figura 9] (Calandra y Roger, 2003; Leng et al., 2003).

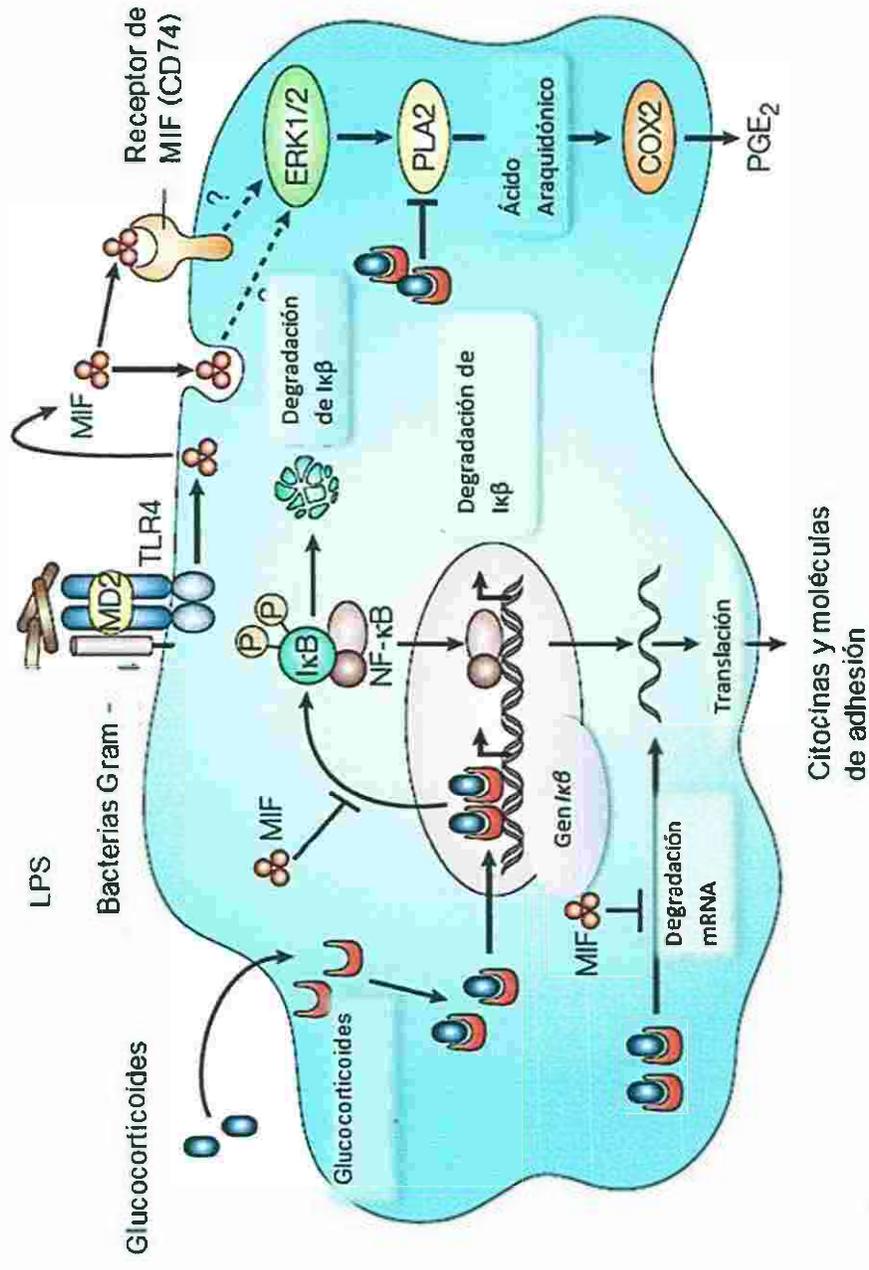


Figura 9. Vías de señalización de MIF (Modificado de Calandra, 2003).

### **Expresión de *TNFA* y *MIF* en artritis psoriásica**

En un estudio realizado por Veale et al., 2005, se analizó la expresión de *TNFA* a nivel de RNA mensajero por el método de RT-PCR en el cual observaron niveles altos del TNF- $\alpha$  en tejido sinovial de pacientes con AP. En otro estudio por inmunohistoquímica, se describió la expresión de TNF- $\alpha$  en la sinovia de pacientes con AP (Danning, 2000). Sin embargo, hasta la actualidad aún no se ha descrito la expresión de *MIF* en AP.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Diseño Metodológico**

#### **Tipo de estudio**

Observacional de casos y controles

#### **Sede del estudio**

- Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas, CUCS, Universidad de Guadalajara.
- Instituto Dermatológico de Jalisco "Dr. José Barba Rubio" de la Secretaría de Salud, Jalisco
- Servicio de Reumatología, OPD-Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde"

#### **Consideraciones éticas**

- El presente trabajo de investigación cumplió con los requisitos del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (publicada en el Diario Oficial de la Federación, última reforma el 03 de Junio de 2014) y se dio cumplimiento a los artículos 100 y 103 del Título Quinto
- Normas y principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos establecidos en la Declaración de Helsinki en 1964 y revisados por última vez en la 64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013
- Se registró en la comisión de Investigación, Ética y Bioseguridad del CUCS de la Universidad de Guadalajara.
- Se obtuvieron las muestras previa firma del consentimiento informado por parte de los pacientes y sujetos clínicamente sanos (Anexo 2).

## Universo de estudio

Pacientes con AP, clasificados de acuerdo a los criterios CASPAR (Cuadro 3) y SC.

## Criterios de selección

**Cuadro 3. Criterios de selección**

Criterios de selección	
De inclusión	De no inclusión
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Grupo de estudio</b> Pacientes con clasificados conde acuerdo a los criterios de la CASPAR</li><li>• <b>Grupo control</b> Individuos clínicamente sanos</li><li>• <b>Ambos grupos:</b> -Mayores de 18 años de edad -Participación voluntaria y firma de la carta de consentimiento informado</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>-Enfermedades reumáticas sobrepuestas</li><li>-Enfermedades infecciosas</li><li>-Pacientes transfundidos en los últimos 3 meses</li><li>-Pacientes con administración crónica de GCC (glucocorticoides, para bs niveles solubles de MIF)</li><li>-Presencia de infecciones graves como Tuberculosis y SIDA</li></ul>
	De exclusión
	<ul style="list-style-type: none"><li>-Muestra sanguínea insuficiente para la realización de las pruebas requeridas</li><li>-Degradación de la muestra de RNA total.</li></ul>

## Tamaño de muestra

El tamaño de muestra lo realizamos por inclusión continua tomando todos los pacientes con AP que cumplieran criterios de clasificación de CAPAR (2006) de la consulta externa de la Clínica de Psoriasis del Instituto Dermatológico de Jalisco "Dr. José Barba Rubio" en el periodo comprendido de Octubre del 2013 a Mayo del 2014 completando 15 pacientes.

## **Variables**

### ❖ Variables independientes

1. AP

### ❖ Variables dependientes

1. Expresión de *TNFA*
2. Niveles solubles de  $TNF-\alpha$
3. Expresión de *MIF*
4. Niveles solubles de MIF

## **Examen físico**

Tanto para el grupo de estudio y el grupo control se realiza una historia clínica y examen físico completo

## **Variables clínicas para los pacientes con AP.**

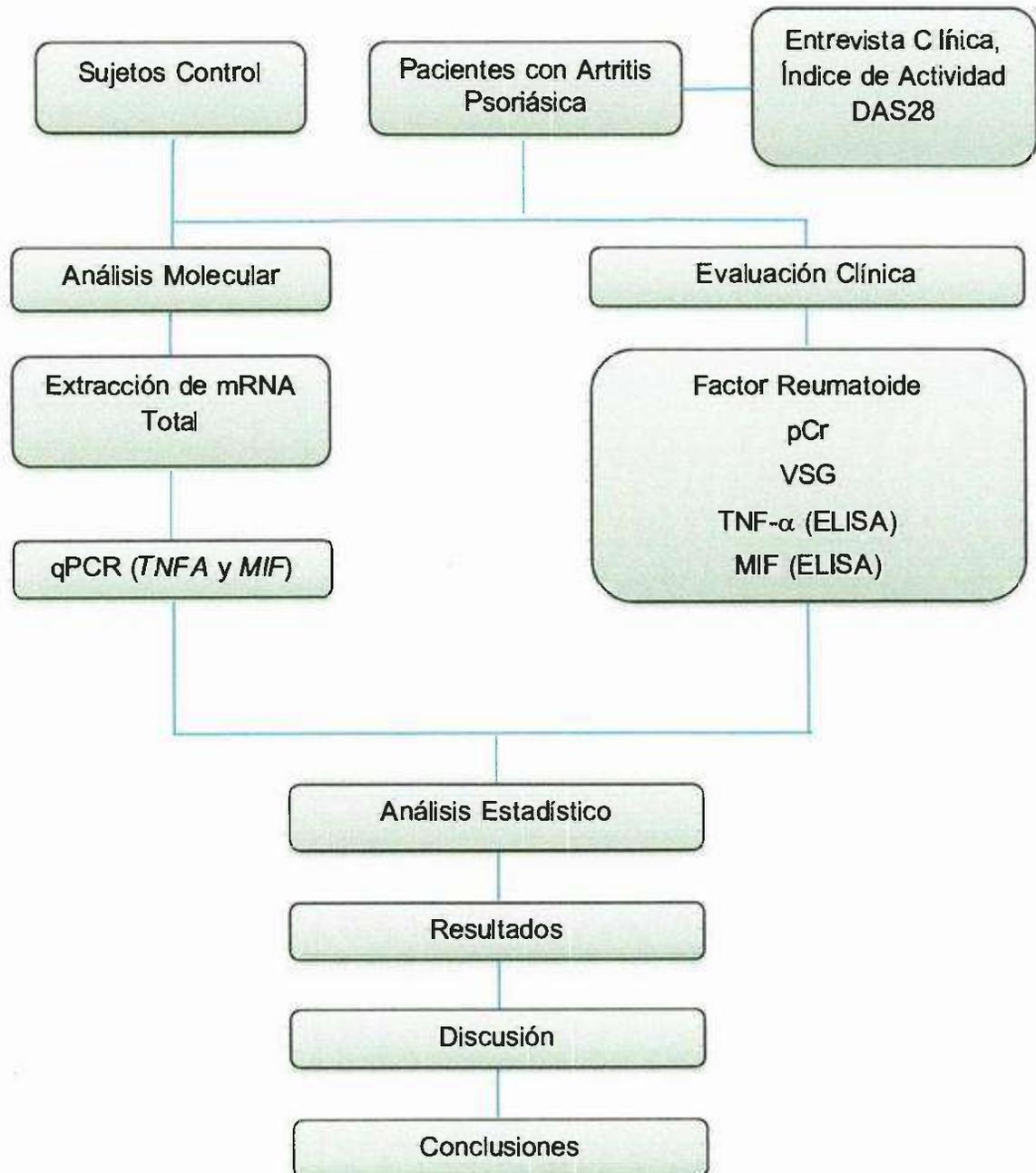
A los individuos del el grupo de estudio se aplica el cuestionario para calcular el Índice DAS 28

## **Pruebas de laboratorio**

A ambos grupos se les realizan las siguientes pruebas:

- pCr (Proteína C Reactiva), por turbidimetría
- Factor reumatoide
- Niveles séricos de MIF por ELISA (Ensayo comercial Legend Max, 6 pg/mL)
- Niveles séricos de  $TNF-\alpha$  por ELISA (Ensayo comercial Invitrogen 1.7 pg/mL)

### Diagrama General de la Metodología de la Evaluación



## Análisis Molecular e Inmunológico

### **Extracción de RNA total**

Para el análisis de la expresión de *TNFA* y *MIF* se procedió a extraer RNA total a partir de leucocitos de sangre periférica.

La extracción de RNA total, se realizó utilizando el método modificado de (Chomczynski y Sacchi, 1987). Para la extracción de RNA total a partir de 5 mL de sangre periférica en un tubo con EDTA se obtuvieron los leucocitos. Brevemente, se transfirieron 5 mL de sangre periférica a un tubo cónico de 15 mL y se agregó 1 mL de Dextran al 5%. A continuación, se mezcló por inversión y se dejó reposar 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo indicado, se recolectó el sobrenadante evitando tomar lo menos posible la capa de eritrocitos y se centrifugó a 1500 rpm durante 25 minutos a una temperatura de 4 °C. Después, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón de células con 600 µL de agua con DEPC (homogeneizando con una pipeta durante 25 segundos). Posterior a ello, se restableció rápidamente la isotonicidad agregando 600 µL de NaCl al 1.8 % y homogeneizando con la pipeta 15 veces. Posteriormente, se centrifugó a 1200 por 15 minutos a una temperatura de 4°C, y se decantó el sobrenadante. Se repitieron estos lavados con agua DEPC y NaCl 1.8 % hasta obtener un botón blanco (aproximadamente 3 veces).

La segunda fase de esta técnica consistió en agregar 200 µL de Trizol al botón de leucocitos obtenidos en la fase anterior, con el cual se resuspendió el botón con ayuda de una pipeta y se dejó reposar por 5 minutos, después se le agregó 40 µL de cloroformo y se homogeneizo en tubos (*Eppendorf*) de 1.6 mL suavemente 5 veces. Posteriormente, se dejó reposar 5 minutos y se procedió a centrifugar a 10,000 rpm a 18 minutos a una temperatura de 4 °C (se observó la formación de 3 fases: superficial: RNA; intermedia: DNA; inferior: proteínas).

Una vez obtenidas las fases, se separó; la fase superficial (RNA) y se transfirió a un nuevo tubo y se le agregó 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol, dejando reposar por 20 minutos en hielo a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Después del tiempo, se centrifugó a 10,000 rpm por 18 minutos a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  y se decantó el sobrenadante, dejando solo el botón de RNA, el cual se lavó una vez con etanol al 75% con agitación suave. Después se centrifugó a 10,000 rpm a 18 minutos a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ , se decantó el sobrenadante con ayuda de la pipeta y se dejó reposar durante 20 minutos para lograr la evaporación del etanol. Lo siguiente fue resuspender el botón de RNA con 10  $\mu\text{L}$  de agua DEPC e inmediatamente se realizó la lectura en un Nanodrop; utilizando 1  $\mu\text{L}$  de RNA.

#### **Técnica de Transcripción Inversa (RT) con *PrimerOligo* (dT)**

Una vez extraído y cuantificado el RNA total, se procedió a realizar la transcripción inversa de la siguiente manera:

Se limpió el área y se esterilizó el material de trabajo para utilizarse posteriormente. Después, se realizaron los cálculos correspondientes para añadir 1  $\mu\text{g}$  del RNA total y ajustar a 15  $\mu\text{L}$  de agua tratada con DEPC. Después se rotularon los tubos y se añadió la cantidad de agua con DEPC calculada para obtener un volumen final de 15  $\mu\text{L}$ . Después, se añadió 1  $\mu\text{L}$  el OligodT, 1  $\mu\text{L}$  de la muestra del RNA total (volumen anteriormente calculado) e inmediatamente se sometió a una temperatura de  $70^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos en un termociclador (alineación del RNA y el *primer*).

Una vez realizado el procedimiento, rápidamente se colocó en hielo y se agregó 10  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción para completar un volumen de 25  $\mu\text{L}$  con las condiciones que se muestran en el Cuadro 4.

Después se incubó a  $42^{\circ}\text{C}$  por 1 hora y se le adicionó 0.5  $\mu\text{L}$  de ribonucleasa H (Conc. Stock 1.5 U/ $\mu\text{L}$ ) y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación se almacenó el cDNA resultante a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Cuadro 4. Condiciones de reacción para la transcripción reversa.**

<b>Reactivo</b>	<b>Con. Stock</b>	<b>Añadir a 1 tubo</b>
<b>Buffer de reacción</b>	5X	5 $\mu$ L
<b>dNTPs</b>	10 Mm	1.25 $\mu$ L
<b>RNAsas</b>	40 $\mu$ / $\mu$ L	0.25 $\mu$ L
<b>MMLVRT</b>	200 $\mu$ / $\mu$ L	1 $\mu$ L
<b>Agua DEPC</b>		2.5 $\mu$ L

## PCR en Tiempo Real

**Sondas de hidrolisis (*TaqMan*).** Para este trabajo, se utilizó la química de las sondas *Taqman*, estas sondas son marcadas con dos tipos de fluorocromos (un donador y un aceptor). Su utilidad radica en que poseen un fluoróforo en su extremo 5' y una molécula en el 3' que bloquea su emisión de fluorescencia (denominada en inglés *quencher*); esta sonda marcada hibrida específicamente en la parte central del producto de PCR a obtener. De este modo, cuando se efectúa la PCR (con la sonda más el par de *primers* específicos), la sonda hibrida en el amplicón, pero debido a la cercanía del fluoróforo al *quencher*, no se emite fluorescencia; cuando la polimerasa se topa con la sonda la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5'-3', lo cual provoca la separación del *quencher* del fluorocromo y, por tanto, la emisión de fluorescencia, la cual está relacionada con la cantidad de amplicón producido (Heid et al., 1996).

La fluorescencia solo es detectable por el espectrofotómetro cuando esta sobrepasa el valor de detección límite del equipo. La fluorescencia de cada tubo se mide en cada ciclo. A partir de esto la señal dobla de ciclo en ciclo, por lo que se observa una curva creciente. El número de ciclo a partir del cual la curva comienza a crecer será proporcional a la concentración inicial de DNA.

Para el gen *MIF* se utilizó la sonda #40 (cat. no. 04687990001) marcada con el fluorocromo FAM (6-carboxifluoresceína) y las siguientes secuencias de *primers* (Figura 10):

Para el gen de *TNFA* se utilizó la sonda #57 (cat. no. 04688546001) que está marcada con el fluorocromo FAM (6-carboxifluoresceína) y las siguientes secuencias de *primers* (Figura 11):

Assay rank 1

Use probe #40 (cat. no. 04687990001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	18	315 - 332	59	61	accgctcctacagcaagc
Right	22	388 - 409	60	45	cgggttcattgctcgttaatagttg
Amplicon (95 nt)					
accgctcctacagcaagctgctgtgggcctgctggcggagcgcctggcattcagcccggaagggtctacatcaactattacgacatg aacgcg					

Figura 10. Sondas e iniciadores para el gen TNFA.

Assay rank 1

Use probe #57 (cat. no. 04688546001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	18	216 - 233	59	61	cgctccccaagaagacag
Right	20	256 - 275	59	55	agaggctgaggaacaagcac
Amplicon (60 nt)					

cgctccccaagaagacagggggggcccccagggtccagggggtgtgttctctcagcctct

Figura 11. Sonda e iniciadores para el gen MIF.

Como gen constitutivo de referencia se utilizó el gen *GAPDH* (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa). La sonda para *GAPDH* se encuentra marcada con el fluorocromo Yellow-555 (cat. no. 05190541001) y se utilizaron las siguientes secuencias de *primers*:

Sentido: 5'-CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC-3'

Antisentido: 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'

### **Procedimiento para la reacción de qPCR en tiempo real**

La qPCR se realizó en el equipo Ligth Cycler® Nano (Roche) con las siguientes condiciones:

#### **Materiales**

- Puntas 10 µL con filtro estériles
- Puntas 200 µL con filtro estériles
- Tubos de 0.5 µL para qPCR
- Tubos eppendorf de 1.5 µL
- Agua DEPC
- Gasas
- Micropipetas

#### **Procedimiento**

En un tubo eppendorf de 0.6 µL se preparó por separado la mezcla de reacción para nuestros genes blanco [*TNFA*, *MIF*] (Cuadro 5 y 6) y para el gen de referencia Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa [*GAPDH*] (Cuadro 7) de la forma siguiente:

### Condiciones de reacción para la qPCR para *TNFA*

Cuadro 5. Condiciones de reacción para la qPCR de *TNFA*.

Componentes	Concentración por tubo
Master mix	5 $\mu$ L
Primer sentido	0.2 $\mu$ L
Primer antisentido	0.2 $\mu$ L
Sonda	0.2 $\mu$ L
Agua	1.9 $\mu$ L
cDNA	2.5 $\mu$ L

### Condiciones de reacción para la qPCR para *MIF*

Cuadro 6. Condiciones de reacción para la qPCR de *MIF*.

Componentes	Concentración por tubo
Mastermix	5 $\mu$ L
PrimerS	0.2 $\mu$ L
Primer A	0.2 $\mu$ L
Sonda	0.2 $\mu$ L
Agua	1.9 $\mu$ L
cDNA	2.5 $\mu$ L

### Condiciones de reacción para la qPCR de *GAPDH*

Cuadro 7. Condiciones de reacción para la qPCR de *GAPDH*

Componentes	Concentración por tubo
Master mix	5 $\mu\text{L}$
<i>Primermix</i>	0.2 $\mu\text{L}$
Sonda	0.2 $\mu\text{L}$
Agua	2.1 $\mu\text{L}$
cDNA	2.5 $\mu\text{L}$

Después se le agregaron a los tubos 7.5  $\mu$ L de master mix correspondiente del gen de interés y el gen constitutivo usando como base el mapa de los pocillos, seguido de esto se añadió 2.5  $\mu$ L del cDNA de la muestra para obtener un volumen final de 10  $\mu$ L. Posteriormente, se taparon los tubos, se aseguró de que los tubos no tuvieran burbujas, de ser así se centrifugó para romper las burbujas, después se prendió el termociclador y se programó las condiciones de PCR utilizando el software del equipo, posterior a la programación se colocaron los tubos en el termociclador en el orden del mapa y se inició la reacción

#### **Procedimiento para la curva de validación de PCR en Tiempo Real**

Para la curva de calibración de *TNFA* y *MIF* se calcularon las diluciones para preparar las soluciones estándar, el preparado se efectuó en tubos por separado.

#### **Cálculos para la curva de validación**

El método para el análisis de los niveles relativos de mRNA de *TNFA* y *MIF*, fue el método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , puesto que se determinó como un método adecuado para la cuantificación relativa a través de qPCR, pues nos permite la comparación de la expresión de los genes de interés contra un gen de referencia en unidades relativas de expresión (URE).

Con base en el método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  se realizó la curva de validación, para la observación de la amplificación de los genes de interés (*TNFA* y *MIF*) así como el de referencia (*GAPDH*), entre los que se debe observar una similitud. Un método sensible utilizado para observar si dos amplicones tienen la misma eficiencia es observar las variaciones de los  $\Delta Cq$  ( $\Delta Cq = \Delta Cq_{GAPDH} - \Delta Cq_{TNFA}$  o  $\Delta Cq_{MIF}$ ) en distintas diluciones. Para lo cual se calculó el  $\Delta Cq$  de los Cq que se obtuvieron en el qPCR, donde se amplificaron diluciones de cDNA de un SC para los genes (*TNFA*, *MIF* y *GAPDH*) [Cuadro 8 y 9]. Posteriormente se graficaron los resultados (Figura 12 y 13) y se obtuvieron los valores de las pendientes para cada gen ( $y =$

$0.08557 \text{Log}(x) + 2.44$  para *MIF* y  $Y = 0.001X + 11.4$  para *TNFA*) las cuales son cercanas a cero, indicativo de que nuestros genes blanco y los genes de referencia son similares por lo que se podríamos utilizar el cálculo  $\Delta\Delta Cq$  para cuantificar la expresión relativa de nuestros genes de interés de acuerdo a lo sugerido por Livak y Schmittgen, 2001.

**Cuadro 8. Diluciones de qPCR para generar la curva de validación para TNFA por método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .**

Dilución ng/dL	TNFA	GAPDH	(CqTNFA- CqGAPDH) $\Delta Cq$
1000			
1000	18.08	30.93	12.85
1000	18.46	30.82	12.36
500	19.92	31.35	11.44
500	19.89	31.39	11.49
500	20.07	31.86	11.78
100	22.33	34.19	11.86
100	22.20	34.04	11.84
100	22.59	33.99	11.40

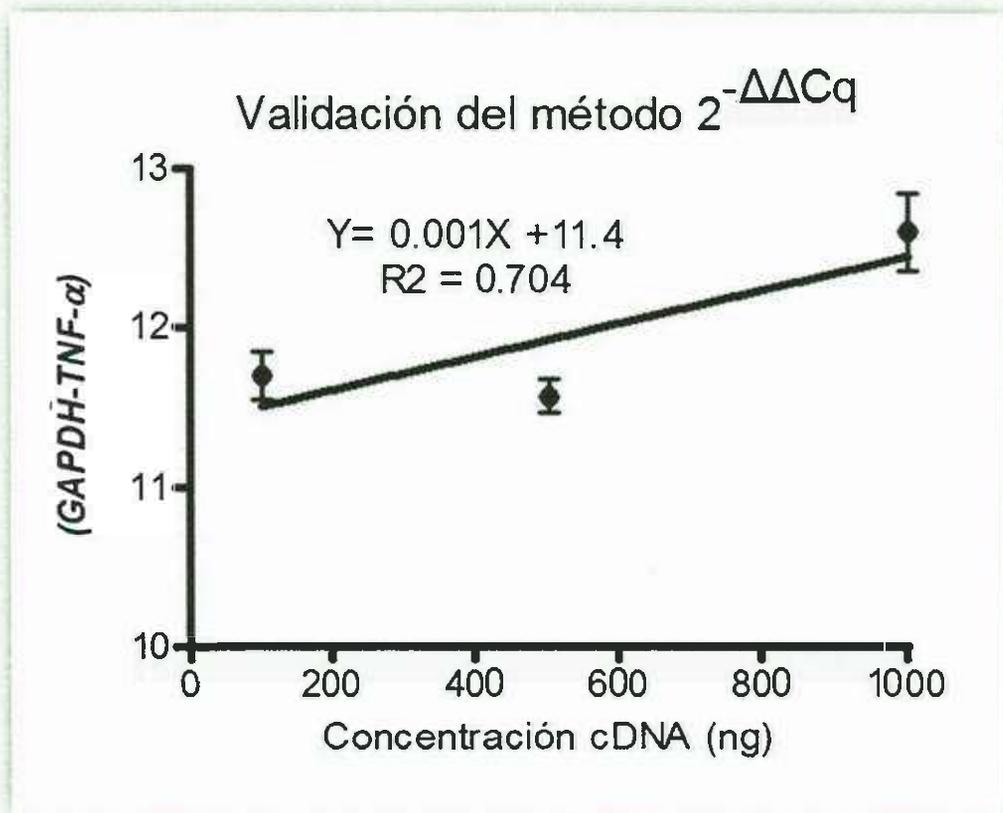


Figura 12. Curva de validación para *TNFA* método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .

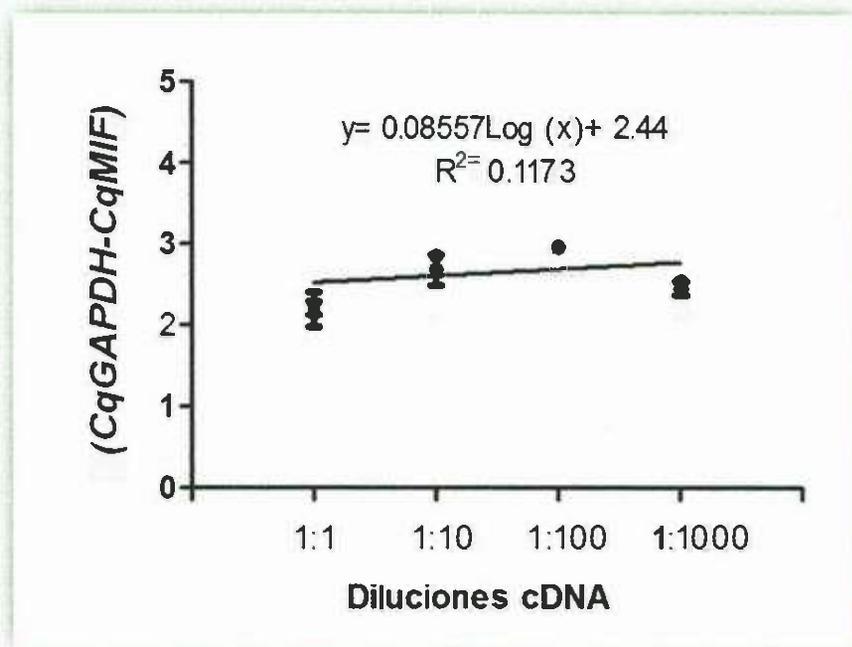


Figura 13. Curva de validación para *MIF* con el método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .

## **Procedimiento para la cuantificación de TNF- $\alpha$ y MIF soluble por ELISA**

**Cuantificación de los niveles de TNF- $\alpha$  soluble.** La cuantificación de los niveles solubles de TNF- $\alpha$  se llevaron a cabo por el método de ELISA utilizando el ensayo (Invitrogen, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite de detección para TNF- $\alpha$  soluble es de 1.7 pg/mL.

El ensayo se realizó de la siguiente manera: todos los reactivos, muestras séricas y estándares fueron llevados a temperatura ambiente antes de su uso y cada ensayo fue corrido por duplicado. Durante el primer paso se agregó 50  $\mu$ L del buffer de incubación a los pozos que vayan a contener los estándares u muestras dejando el pozo reservado para el blanco cromogénico vacío, se procedió a cubrir la placa y se incubo por 2 horas a temperatura ambiente, transcurrida la incubación se desechó la solución y se hicieron 4 lavados usando una pipeta multicanal.

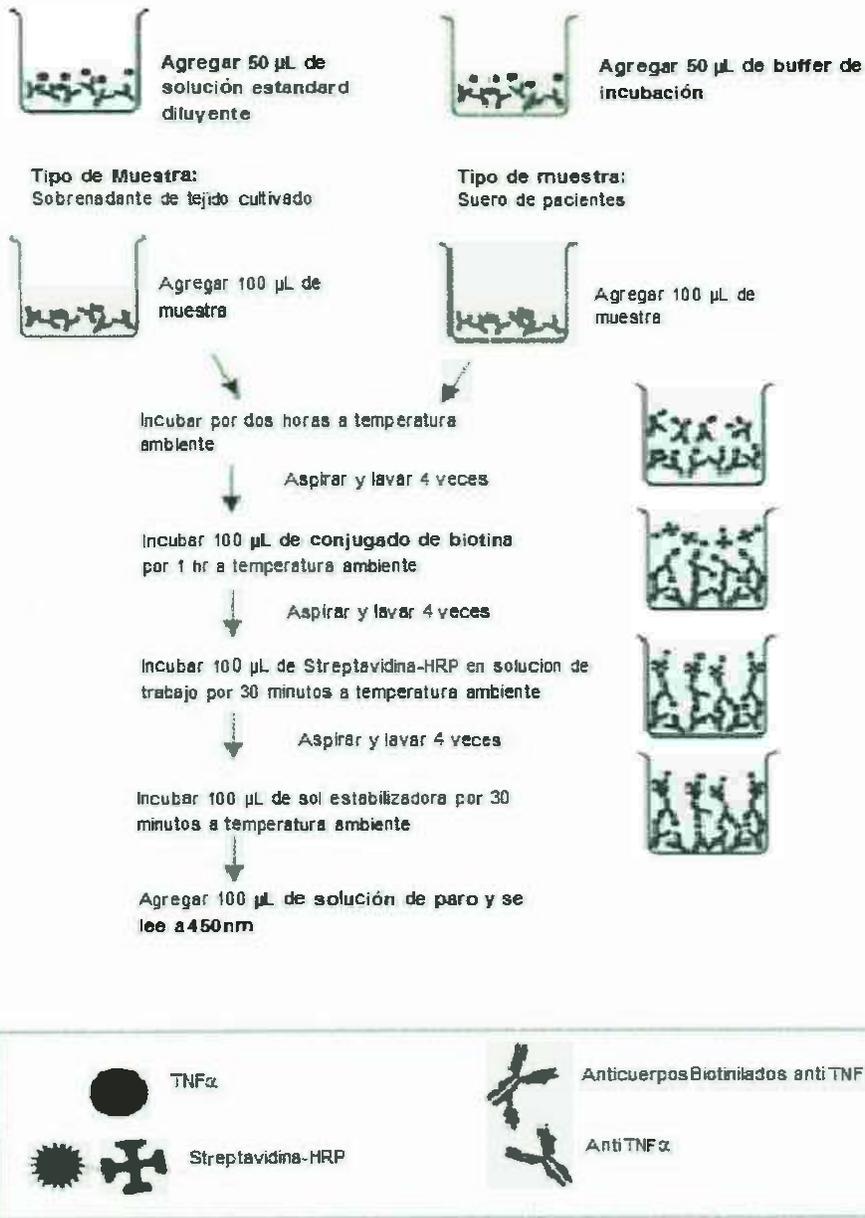
Después del último lavado se removió cualquier remanente de buffer de lavado por aspiración o decantación y se agregaron 100  $\mu$ L de solución de estreptavidina-HRP exceptuado al pozo del blanco cromogénico, se procedió a incubar la placa por 30 minutos a temperatura ambiente realizando también 4 lavados, para después agregar 100  $\mu$ L de TMB en cada pozo e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Transcurrido este tiempo se agregaron 100  $\mu$ L de la solución de paro a cada pozo mezclando suavemente y se leyó la absorbancia de cada pozo a 450 nm en un lector de ELISA dentro de las 2 horas después de agregar la solución de paro (Figura 14).

El cálculo de los resultados se realizó mediante la curva de calibración obtenida en el experimento posterior a graficar el valor de absorbancia de cada estándar (ordenada) contra la concentración del estándar (abscisa). La concentración de los niveles solubles de TNF- $\alpha$  de cada una de las muestras, tanto pacientes como controles, se calcula según la corrección de dicha curva la cual sigue un comportamiento logarítmico.

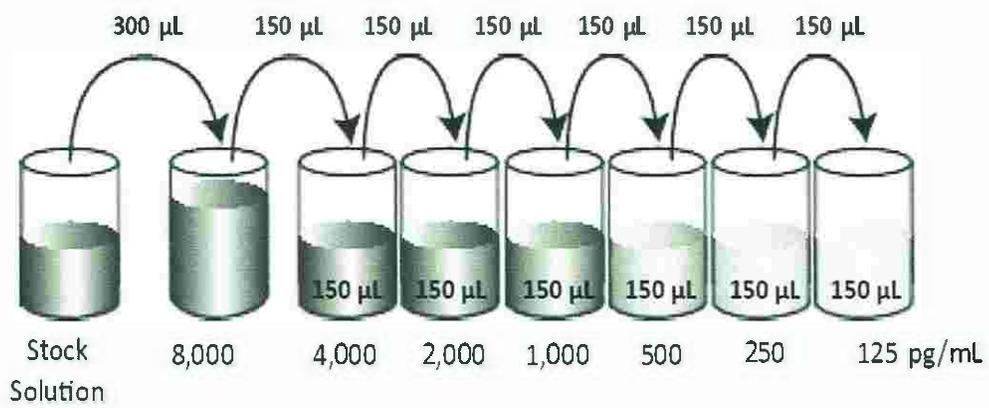
**Cuantificación de MIF soluble.** La cuantificación de los niveles solubles de MIF se llevaron a cabo por el método de ELISA utilizando el kit (Legend Max, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante el límite de detección para MIF es de 6 pg/mL.

El ensayo se realizó de la siguiente manera: todos los reactivos, muestras séricas y estándares fueron llevados a temperatura ambiente antes de su uso y cada ensayo fue corrido por duplicado. Primero se agregaron 100  $\mu$ L de cada estándar y muestra en el pozo asignado en la placa de ELISA, se cubrieron y se incubaron por 2.5 horas a temperatura ambiente, posteriormente se desechó la solución y se lavó 4 veces con solución de lavado 1x, el lavado se realizó llenando cada pozo con buffer de lavado (300  $\mu$ L) usando una pipeta multicanal. Después del último lavado se removió cualquier remanente de buffer de lavado por aspiración o decantación; una vez hecho esto, se agregó 100  $\mu$ L del anticuerpo biotinilado al 1x en cada pozo y se incubó 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave, transcurrida la incubación se desechó la solución y se hicieron 4 lavados (Figura 15).

Una vez removido cualquier remanente de buffer de lavado se le agregó 100  $\mu$ L de solución de estreptavidina-peroxidasa a cada pozo y se incubó por 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave; transcurrido este tiempo, también se descartó la solución y se procedió a hacer 4 lavados con buffer de lavado para posteriormente agregar 100  $\mu$ L de la solución de tetrametilbenzidina (TMB) a cada pozo y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación suave. Por último se le adicionaron 50  $\mu$ L de la solución de paro a cada pozo y se leyó en un lector de ELISA a 450 nm inmediatamente con corrección a 570 nm.

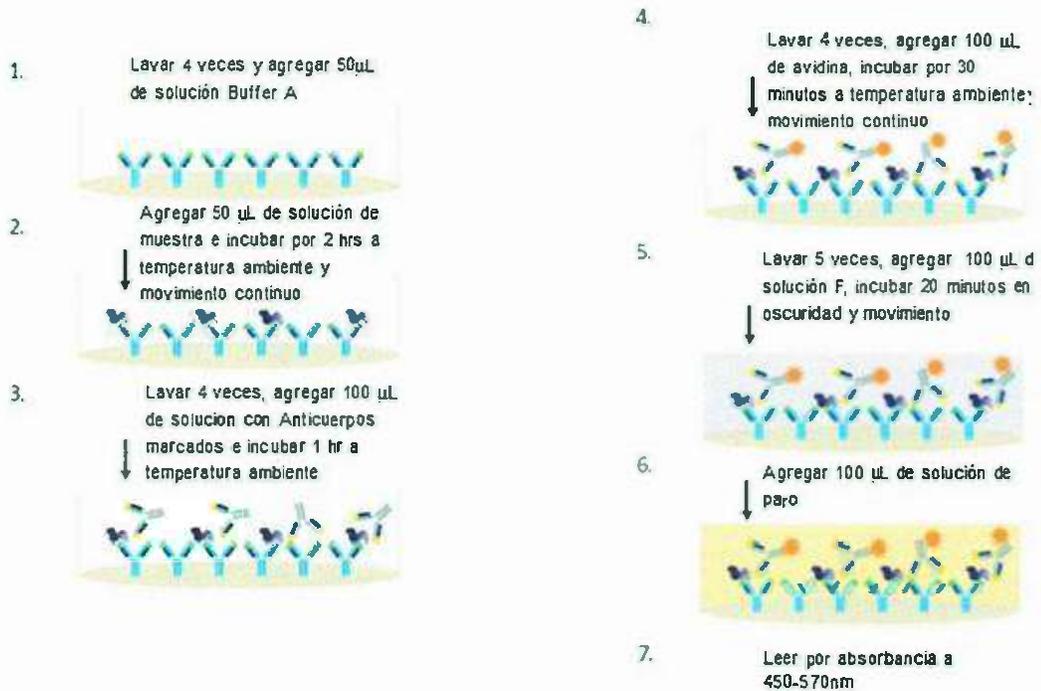


**Figura 14. Procedimiento de la técnica de ELISA para TNF $\alpha$**



**Figura 15. Procedimiento para la curva de calibración para ELISA de MIF**

El cálculo de los resultados se realizó mediante la curva de calibración obtenida en el experimento posterior a graficar el valor de la corrección (absorbancia 450 nm- 570 nm) de cada estándar (Ordenada) contra la concentración del estándar (Abscisa). La concentración de los niveles solubles de MIF de cada una de las muestras, tanto pacientes como controles, se calculó según la correlación de dicha curva, la cual sigue un comportamiento logarítmico (Figura 16).



**Figura 16. Procedimiento de la técnica de ELISA para MIF**

R.T.170063

## Análisis de Estadístico

**Análisis descriptivo.** Medidas de tendencia central (media aritmética, mediana) y medidas de dispersión (desviación estándar, rango, percentiles y rangos intercuartiles).

**Análisis interferencial.** Pruebas paramétricas (t de student, ANOVA de una vía)

**Pruebas no paramétricas.** (Kruskal- Wallis, correlación de Spearman,  $X^2$ , U de Mann-Whitney).

## RESULTADOS

En el presente estudio se incluyeron a 30 sujetos de los cuales se clasificaron dos grupos: 15 sujetos clasificados con AP de acuerdo a los criterios de clasificación CASPAR emitidos en 2006 y 15 SC.

### Características clínicas

Las características clínicas de los pacientes se muestran en el Cuadro 10 en donde la media de edad fue de 51 años  $\pm$  9, de los cuales el 73% pertenecen al género femenino y 27% al masculino, también se muestra una mediana de tiempo de evolución de psoriasis de 12 años y 6 para AP; de acuerdo al índice de actividad DAS28, el 7% de los pacientes se encuentran en remisión, mientras que el 60% presenta actividad de la enfermedad moderada y un 33% con actividad alta.

La media de factor reumatoide en los pacientes fue de 3.19 UI/mL y la media de pCr de 11.7 mg/L. En cuanto a los tipos de psoriasis, el 60% presentó psoriasis en placa, 20% en cuero cabelludo, 13% palmo-plantar y 7% puntata; de los tipos de afectación ungueales, con distrofia se presentaron 20%, hipertrofia 20%, puntilleo 40% y los pacientes sin afectación en uñas fue del 20%; el 20% de los pacientes utilizaron metotrexate con posología de 7.5-10 mg/semana y con 12.5-20 mg/semana 20%, con tratamiento tópico 26.5%, con medicamentos biológicos el 7% y sin tratamiento el 26.5%.

**Cuadro 10. Características clínicas y demográficas de los pacientes con AP.**

<b>Variables</b>	<b>n=15</b>
<b>Demográficas</b>	
Edad (años) <sup>a</sup>	51 ± 9
Género % (n) <sup>b</sup>	
Masculino	27 (4)
Femenino	73 (11)
<b>Estado de la enfermedad</b>	
Tiempo de evolución de psoriasis (años) <sup>c</sup>	12 (8-20)
Tiempo de evolución de AP (años) <sup>c</sup>	6 (3-10)
<b>Evaluación clínica</b>	
Puntuación DAS-28 <sup>a</sup>	4.93 ± 1.29
DAS-28 <sup>b</sup>	
Remisión (2.6)	7 (1)
	60 (9)
Actividad baja (<3.2)	
Actividad alta (≥5.1)	33 (5)
Factor reumatoide UI/mL <sup>a</sup>	3.19 (2.44-8.76)
Proteína C reactiva (mg/L) <sup>a</sup>	11.7(7.8-27.8)
<b>Tipo de psoriasis<sup>b</sup></b>	
Placa	60 (9)
Cuero cabelludo	20 (3)
Palmo-plantar	13 (2)
Puntata	7 (1)
<b>Afectación de uñas<sup>b</sup></b>	
No afectada	20 (3)
Distrofia	20 (3)
Hipertrofia	20 (3)
Puntilleo	40 (6)
<b>Tratamiento<sup>b</sup></b>	
Metotrexate (7.5-10 mg/semana)	20 (3)
Metotrexate (12.5-20 mg/semana)	20 (3)
Tópico	26.5 (4)
Biológicos	7 (1)
Sin tratamiento	26.5 (4)

<sup>a</sup>Datos proporcionados en media ± desviación estándar. <sup>b</sup>Datos proporcionados en porcentajes y n. <sup>c</sup>Datos proporcionados en mediana (percentil 5- percentil 95)

En este estudio de casos y controles se realizó el análisis de expresión del mRNA de *TNFA* y *MIF* por la técnica de qPCR en pacientes con AP y SC. Se comparó la expresión de ambas citocinas entre los grupos de pacientes con AP y el grupo SC, observándose que la expresión de mRNA de *TNFA* es 138.16 veces mayor en los pacientes con AP respecto a los SC. En el nivel de expresión del mRNA de *MIF*, el grupo de SC mostraron 0.14 veces más expresión que los pacientes con AP (Gráfico 1).

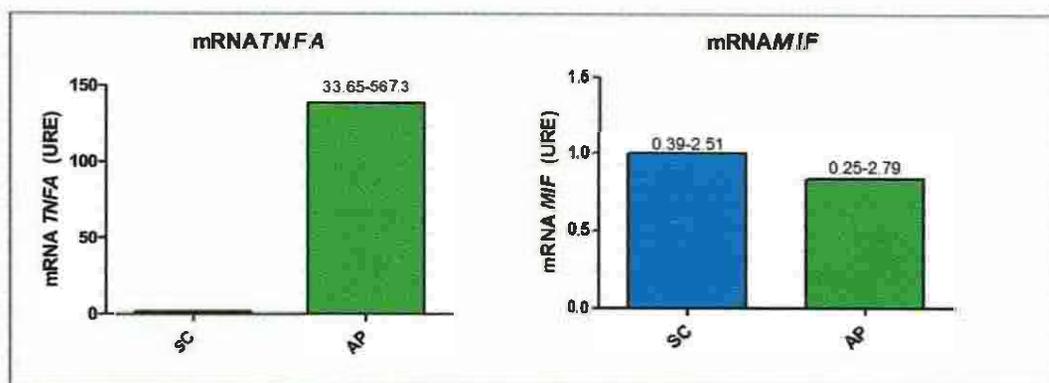


Gráfico 1. Expresión del mRNA de *TNFA* y *MIF* en pacientes con AP y SC

Se realizó un análisis comparativo de la expresión de ambas citocinas con características clínicas de interés pertenecientes al grupo de pacientes con AP. Los niveles de expresión de mRNA de *TNFA* en el grupo de pacientes, se encontró 0.25 veces más expresión en el género masculino respecto al femenino, por otra parte la expresión de mRNA de *MIF* fue 2.29 veces más expresión en el grupo femenino (Gráfico 2).

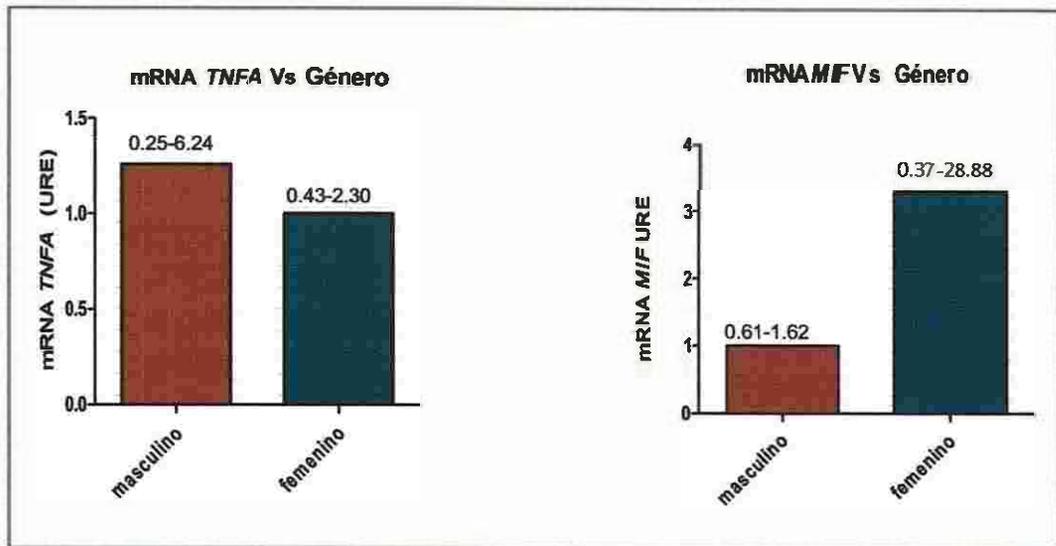


Gráfico 2. Expresión del mRNA de *TNFA* y *MIF* en relación al género

En la comparación de los niveles de expresión de *TNFA* se encontró que en el grupo de pacientes con AP es 4.80 veces más elevado en los sujetos no fumadores comparado con los pacientes con registro de tabaquismo; en cuanto a la expresión de *MIF* en el mismo grupo, aquellos pacientes fumadores mostraron 0.72 veces más que los pacientes no fumadores (Gráfico 3).

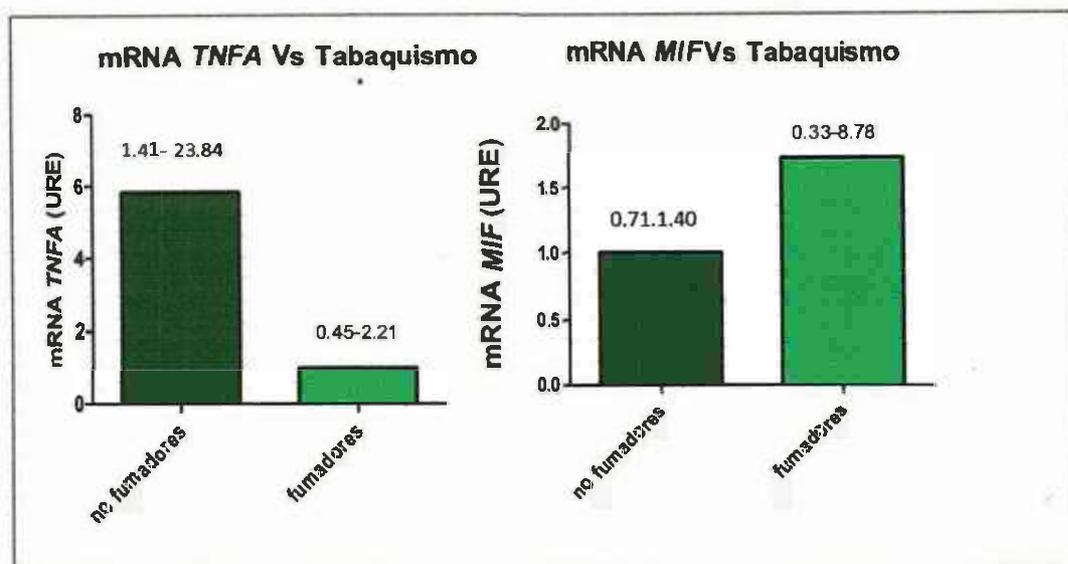


Gráfico 3. Expresión del mRNA de *TNFA* y *MIF* en relación al hábito de fumar.

Por otro lado al ser comparadas los niveles de expresión de mRNA de *TNFA* en aquellos pacientes con AP que tenían más de 5 años de inicio de afectación articular, presentaron 0.72 veces mayor expresión que el grupo con menor tiempo de afectación, mientras que la expresión de mRNA de *MIF* fue 0.33 veces más en aquellos pacientes con un inicio de la afectación articular menor o igual a 5 años (Gráfico 4).

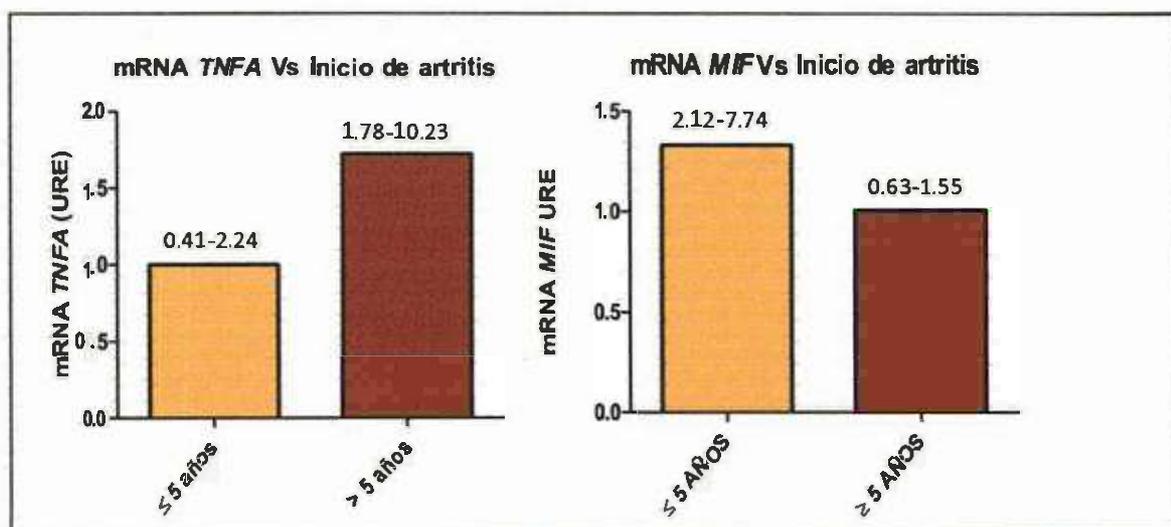


Gráfico 4. Expresión del mRNA de *TNFA* y *MIF* agrupados en  $\leq 5$  años y  $> 5$  años de evolución de AP.

El nivel de expresión de mRNA de *TNFA* fue 0.72 veces más en aquellos pacientes de AP con mayor o igual a 10 años de inicio de psoriasis respecto aquellos que solo tenían menos de 10 años. Mientras que la expresión de mRNA de *MIF* fue 0.37 veces más en los pacientes con menor o igual a 10 años del inicio de psoriasis (Gráfico 5).

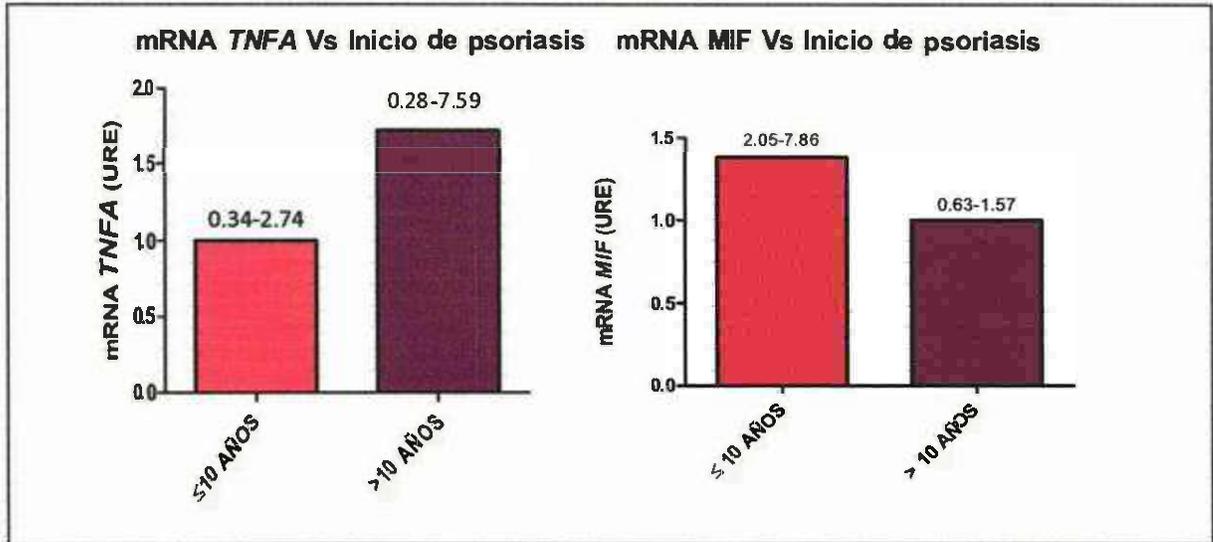


Gráfico 5. Expresión del mRNA de *TNFA* y *MIF* agrupados en  $\leq 10$  años y  $> 10$  años de la psoriasis.

Para la comparación con el índice de actividad de la enfermedad DAS28, los niveles de expresión se analizaron dividiendo al grupo en dos categorías; una categoría donde se agrupó a los pacientes con actividad baja y moderada y otra con actividad alta. La expresión del mRNA de *TNFA* fue 0.46 veces más en los pacientes con actividad baja y moderada en comparación con los que tienen una actividad de la enfermedad alta. Por otro lado la expresión de mRNA de *MIF*, fue 1.27 veces más en los pacientes que presentan actividad de la enfermedad alta (Gráfico 6).

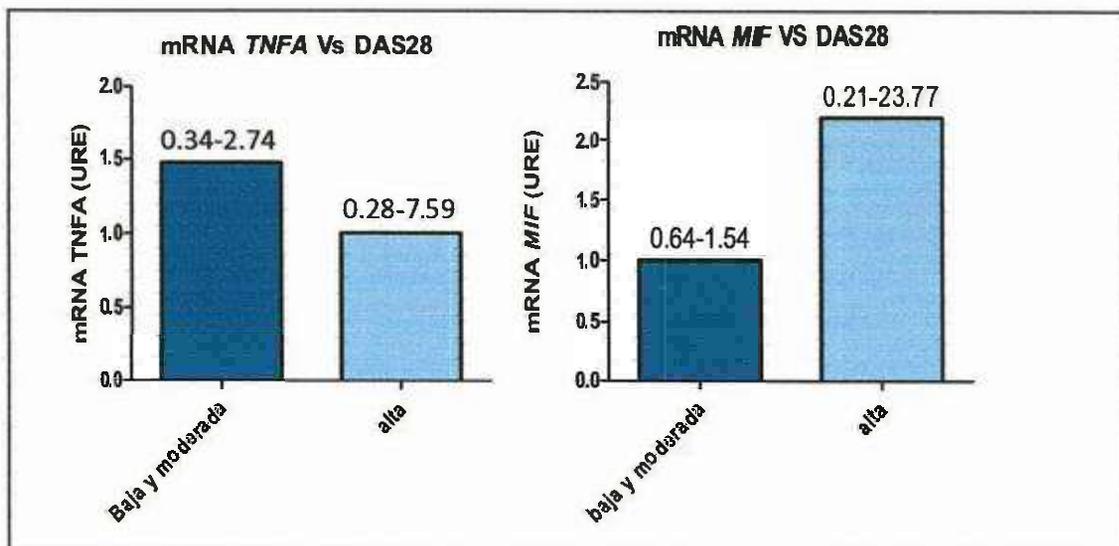


Gráfico 6. Expresión del mRNA de *TNFA* y *MIF* en relación al índice de actividad DAS28

Al comparar a los pacientes con AP con afectación de la piel mayor al 20% de la superficie corporal se observó que tuvieron 1.83 veces más nivel de expresión de mRNA de *TNFA*, que aquellos que con una afectación menor o igual al 20%. En los niveles de mRNA de *MIF*, los pacientes con afectación menor o igual al 20% mostraron 0.58 veces más expresión comparados con aquellos con afectación mayor al 20% en la piel (Gráfico 7).

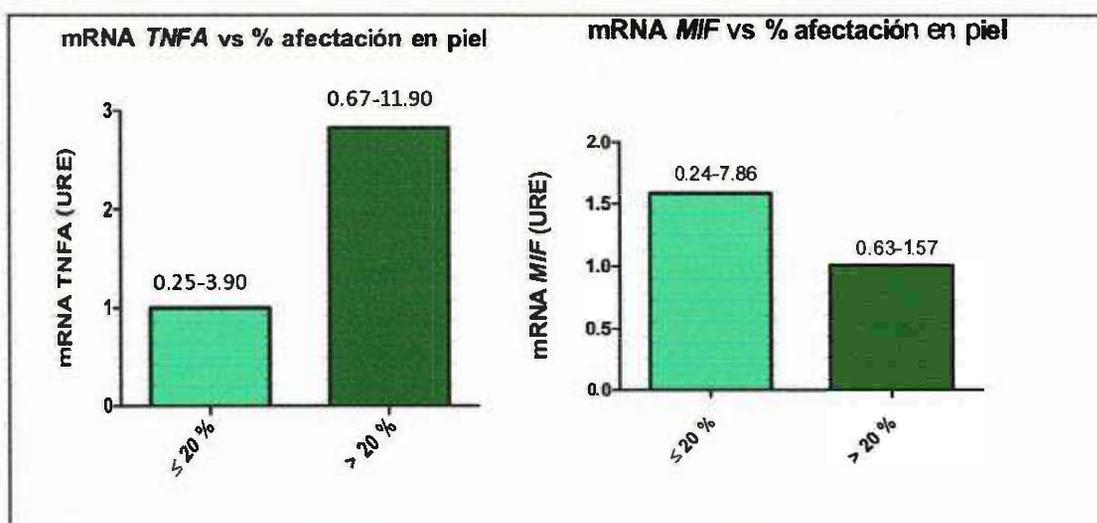
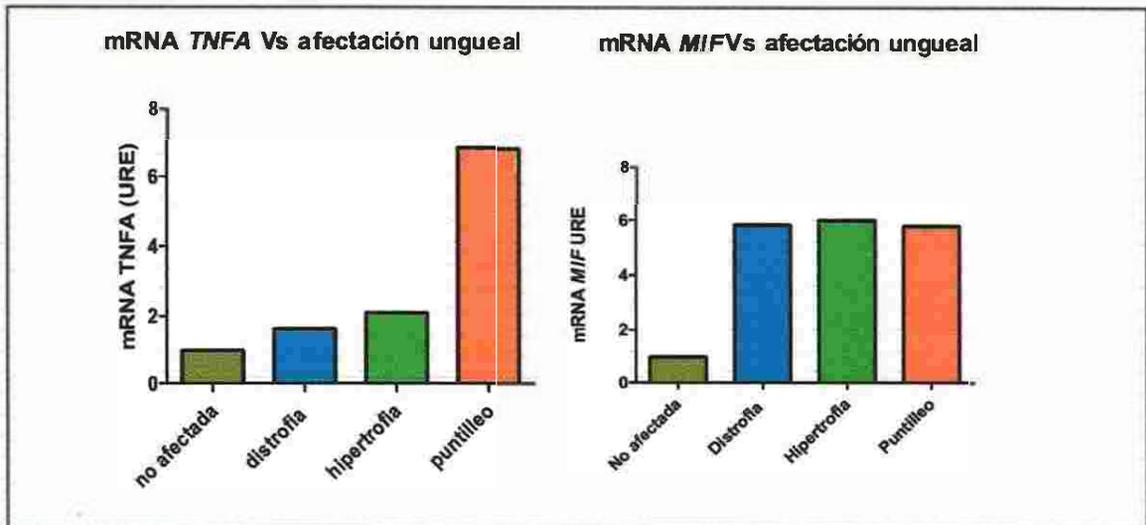


Gráfico 7. Expresión del mRNA de *TNFA* y *MIF* en relación al porcentaje de afectación de la piel.

En los pacientes con afectación en uñas, se encontró que los niveles de expresión de mRNA de *TNFA* fueron de 5.84 veces más expresión en los pacientes de AP con puntillero ungueal; 1.09 veces más expresión en los pacientes con hipertrofia ungueal y 0.62 veces más expresión en los pacientes con distrofia ungueal. Todos los tipos de afectación se compararon con aquellos pacientes de AP que no mostraron alguna afectación en uñas. Asimismo los niveles de expresión de mRNA de *MIF* se equipararon, con los pacientes de AP sin afectación ungueal con aquellos con algún tipo de afectación donde se observó que los pacientes con hipertrofia ungueal tienen 4.99 veces más expresión; 4.83 veces más expresión los pacientes con distrofia ungueal y 4.78 veces más expresión los pacientes con puntillero ungueal (Gráfico 8).



**Gráfico 8. Expresión del mRNA de *TNFA* y *MIF* con diferentes grados de afectación ungueal en pacientes con AP.**

Asimismo, los niveles de expresión de mRNA de *TNFA* y *MIF* se compararon con los percentiles 25, 50 y 75 (p25, p50, p75) de los niveles solubles de TNF- $\alpha$ . Los pacientes con una concentración sérica de  $\geq 20.62$  pg/mL (p25) mostraron 0.39 veces más nivel de expresión de mRNA de *TNFA* que aquellos con sTNF- $\alpha$  de  $< 20.62$  pg/mL; los pacientes con sTNF- $\alpha$  de  $\geq 24.61$  pg/mL (p50) mostraron 1.55 veces más expresión de mRNA de *TNFA* que

aquellos con sTNF- $\alpha$  de <24.61 pg/mL; los pacientes con sTNF- $\alpha$  de  $\geq$ 28.94 pg/mL (p75) mostraron 0.45 veces más expresión de mRNA de *TNFA* que aquellos con sTNF- $\alpha$  de <28.94 pg/mL.

En cuanto a los niveles de mRNA de *MIF*, los pacientes con una concentración sérica <20.62 pg/mL (p25) de sTNF- $\alpha$  mostraron 2.52 veces más nivel de expresión de mRNA de *MIF* que aquellos con sTNF- $\alpha$   $\geq$ 20.62 pg/mL; los pacientes con sTNF- $\alpha$  <24.61 pg/mL (p50) mostraron 1.23 veces más expresión de mRNA de *MIF* que aquellos con sTNF- $\alpha$   $\geq$ 24.61 pg/mL; los pacientes con sTNF- $\alpha$  <28.94 pg/mL (p75) mostraron 0.88 veces más expresión de mRNA de *MIF* que aquellos con sTNF- $\alpha$   $\geq$ 28.94 pg/mL (Gráfico 9).

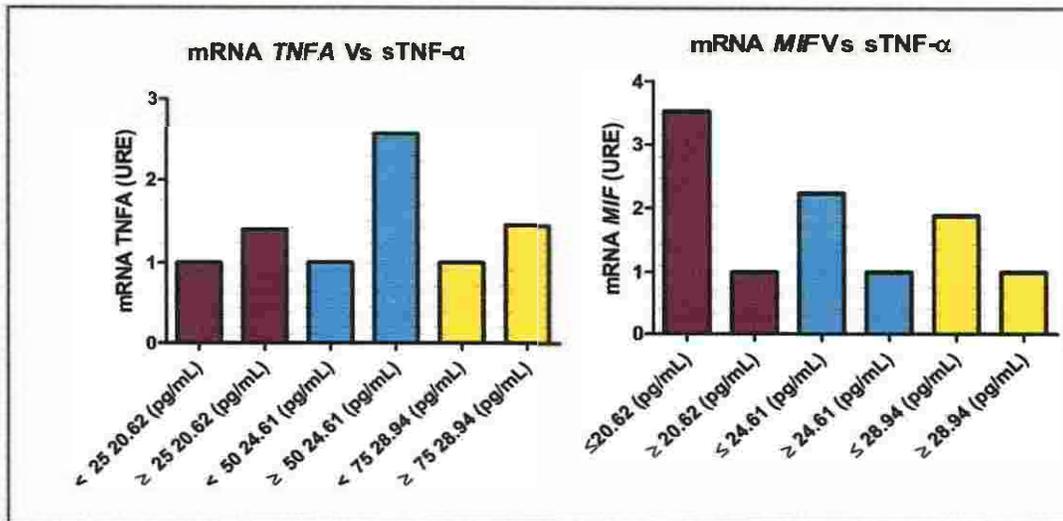


Gráfico 9. Relación de niveles solubles de TNF- $\alpha$  y la expresión del mRNA de *TNFA* y *MIF* en pacientes con AP.

Los niveles séricos de MIF de los pacientes con AP se compararon con sus niveles de expresión de mRNA de *TNFA* y *MIF*. Los valores de sMIF se clasificaron en aquellos de concentración < 6 ng/mL y > 6 ng/mL.

Los niveles de expresión de mRNA de *TNFA* mostraron 0.59 veces más en pacientes de AP con concentración de sMIF <6 ng/mL. Los niveles de expresión de mRNA de *MIF* en pacientes con niveles séricos >6 ng/mL de sMIF fue de 0.84 veces más que aquellos <6 ng/mL de sMIF (Gráfico 10).

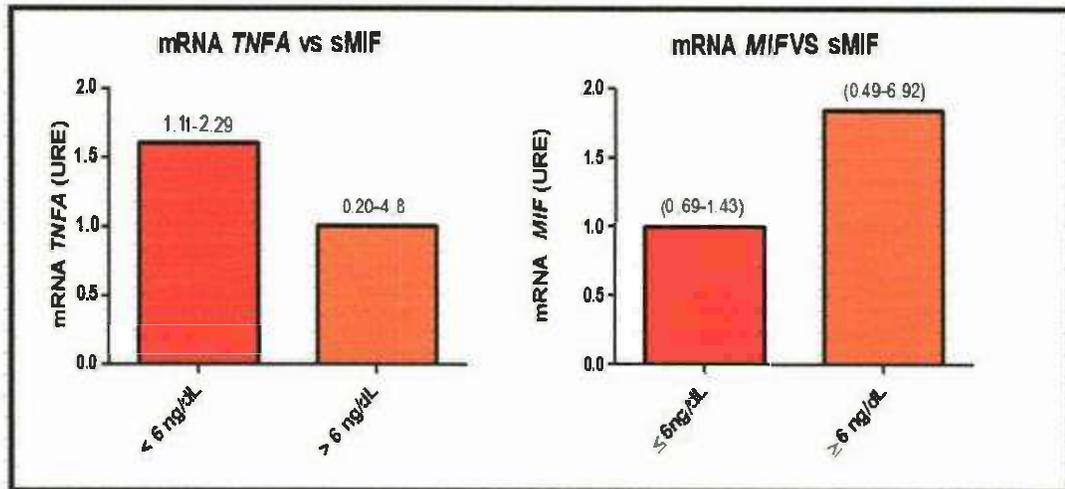


Gráfico 10. Relación de niveles solubles de MIF y expresión del mRNA de *TNFA* y *MIF* en pacientes con AP.

Los niveles de sMIF en pacientes con AP presentaron niveles de 7.71 ng/mL (6.55-9.41) mientras que los SC presentaron niveles 6.06 ng/mL (3.6-8.52), sin diferencias significativas.

Los niveles séricos de TNF- $\alpha$  en pacientes con AP presentaron niveles de 24.61 pg/mL (20.82-28.94) y los SC presentaron niveles 10.62 pg/mL (7.65-15.10) donde se observó una diferencia marginal  $p=0.05$  (Figura 17).

Se determinó el coeficiente de correlación de los niveles solubles de TNF- $\alpha$  y MIF con las características clínicas de interés (Cuadro 11).

En la Figura 18, se presenta la correlación de TNF- $\alpha$  con DAS28, donde se observa una asociación entre ambas, en pacientes con AP.

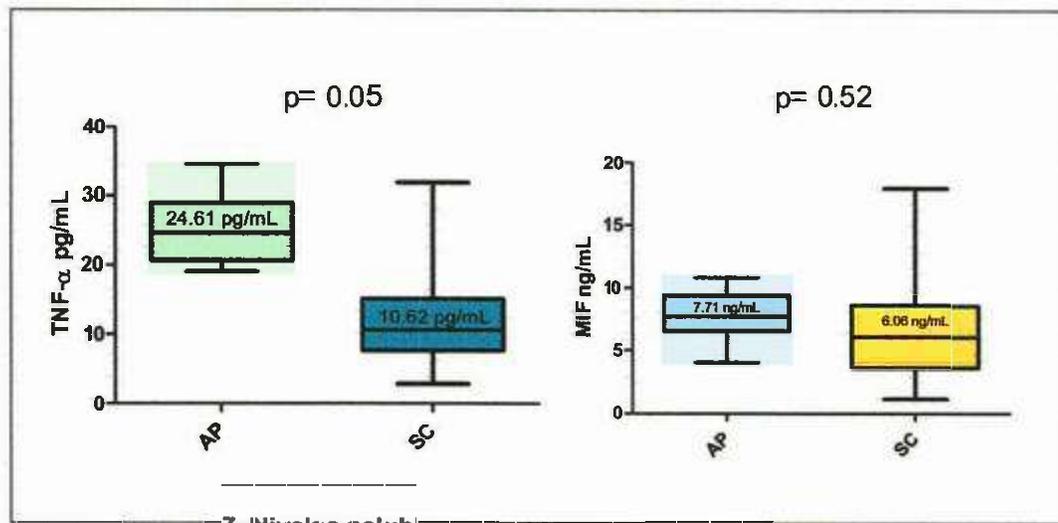


Figura 1. Niveles séricos de TNF-α y MIF en pacientes con AP y SC.

**Cuadro 11. Coeficiente de correlación**

Variable	MIF (ng/mL)		TNF- $\alpha$ (pg/mL)	
	$r^*$	Valor <i>p</i>	$r^*$	Valor <i>p</i>
Proteína C reactiva (mg/dL)	0.4071	0.1320	0.2786	0.3147
Factor reumatoide	-0.2226	0.4252	-0.3250	0.2372
Inicio de psoriasis	-0.06816	0.8093	-0.1883	0.5014
Inicio de la artritis	-0.1189	0.6729	-0.05586	0.8433
TNF- $\alpha$ soluble	-0.01786	0.9496		
<b>DAS28</b>	<b>-0.2538</b>	<b>-0.2538</b>	<b>-0.6881</b>	<b>0.0046</b>

\*Coeficiente de correlación de Spearman.

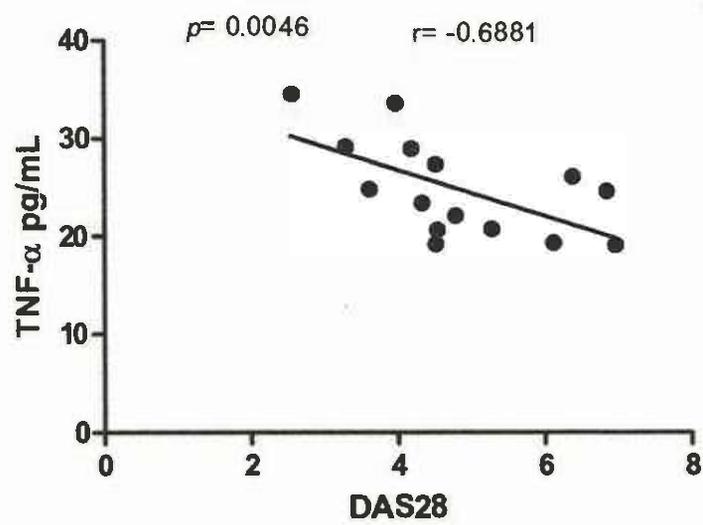


Figura 18. Representación de la asociación de DAS28 con TNF- $\alpha$  soluble

## DISCUSION

En diversos estudios se ha descrito la participación de citocinas proinflamatorias en la patogenia de la AP, sin embargo, una de las citocinas que se encuentra principalmente involucrada es TNF- $\alpha$ , el cual es un inductor de inflamación (González et al., 2012). Otra citocina relacionada es MIF, que se relaciona con la activación de macrófagos y promueve la producción de otra citocinas proinflamatorias (Calandra y Roger, 2003; Denkinger et al., 2004). Por esta razón fue de nuestro interés analizar la expresión de mRNA y los niveles solubles de TNF- $\alpha$  y MIF.

En este estudio se comparó el incremento de la expresión de mRNA entre los grupos de pacientes con AP y SC, en el cual se observa una alta expresión de *TNFA* en el grupo de pacientes con AP (138.16 veces más expresión) con respecto al grupo SC. En contraste, los pacientes con AP muestran altos niveles de expresión de *TNFA*. Estos hallazgos son similares a los reportados por Veale et. al., 2005, donde se analizó la expresión del mRNA de *TNFA* utilizando qPCR, en el cual observó un incremento en la expresión de *TNFA* en pacientes con AP. También se comparó los niveles solubles de TNF- $\alpha$  en ambos grupos y se observó un incremento de la citocina en el grupo de pacientes con AP. Este estudio concuerda con el realizado por Danning et. al., 2000, quien describe mediante el análisis de la expresión por inmunohistoquímica, un incremento de TNF- $\alpha$  en la sinovia de pacientes con AP.

Los resultados de expresión y de niveles solubles observados en este estudio de TNF- $\alpha$  coinciden con los descritos por otros autores. Sin embargo, la expresión de MIF en el grupo de SC fue más alta comparada con el grupo pacientes con AP, en estos datos no se observa una asociación entre la expresión del mRNA de *MIF* con los niveles solubles de esta citocina en AP.

En este estudio de casos y controles se analizó la asociación de la expresión de ambas citocinas entre distintas variables de interés. Al comparar la expresión de *MIF* con distintas concentraciones de TNF- $\alpha$  soluble, la expresión disminuye en concentraciones altas de TNF- $\alpha$  y viceversa, estos resultados sugieren un posible antagonismo entre ambas moléculas, sin embargo, esta interpretación debe tomarse con precaución, puesto que en varios estudios como los realizados por Wijbrandts et. al., 2008 y Shimizu et. al., 2001 donde reportan que *MIF* puede estimular la producción de TNF- $\alpha$  y viceversa en otras enfermedades como artritis reumatoide. Por otro lado, la expresión de *MIF* es mayor en el género femenino del grupo de pacientes con AP. Estos datos sugieren que los estrógenos posiblemente promuevan la expresión de esta citocina en el género femenino. Cutolo et. al., 2006 en su estudio describe que los estrógenos pueden modular la liberación de citocinas proinflamatorias de macrófagos activados en enfermedades autoinmunes.

Kinahan et. al., 2014 en su estudio describe que fumar se asocia con el desencadenamiento de psoriasis y con el incremento en la producción de citocinas proinflamatorias asociadas a la psoriasis, en nuestro análisis los pacientes fumadores mostraron altos niveles de expresión de *MIF*, este dato sugiere que las sustancias contenidas en el humo del cigarro aumentan la producción de *MIF* en macrófagos y en otras células productoras de esta citocina, como se menciona en el estudio realizado por Damico et. al., 2009 en el que se describe que la expresión de la proteína *MIF* es incrementado por extractos en el humo del cigarro en células endoteliales pulmonares. Por otro lado, Warr et. al., 1973 describió en su estudio que el humo del cigarro tiene influencia sobre la velocidad de migración de los macrófagos alveolares en fumadores. Posiblemente el humo del cigarro pueda potenciar la migración de los macrófagos promoviendo al proceso inflamatorio en AP.

Nuestros resultados muestran una alta expresión de *MIF* en un inicio de psoriasis menor a 10 años y en afectación de piel menor del 20%, esto

sugiere una participación de MIF con el desarrollo temprano de psoriasis. Por otro lado, TNF- $\alpha$  no es consistente con este comportamiento al presentar mayor expresión en pacientes con psoriasis mayor de 10 años y en un porcentaje de afectación en piel mayor del 20%, se infiere que posiblemente TNF- $\alpha$  se exprese mayormente en etapas avanzadas de la psoriasis. También en este estudio, se sugiere una asociación de la expresión de MIF con una actividad alta de artritis en los pacientes con AP. Varios autores describen la participación de TNF- $\alpha$  y MIF en la patogenia de AP (Calandra y Roger, 2003; Denkiner et al., 2004 González et al., 2012), sin embargo, en este estudio la expresión de MIF es mayor en pacientes con algún tipo de afectación ungueal, por lo que se sugiere que MIF se relaciona con la afectación ungueal en pacientes con AP.

En el presente estudio se realizaron correlaciones de los niveles solubles de TNF- $\alpha$  y MIF con características clínicas de interés, sin embargo solo TNF- $\alpha$  presentó una asociación con la actividad clínica evaluada a través del DAS28 ( $p=0.0046$ ).

## CONCLUSIONES

En este trabajo se analizó la expresión del mRNA de *TNFA* y *MIF*, a través de qPCR en tiempo real, en el cual se observa un aumento de la expresión de *TNFA* en concordancia con la cuantificación por ELISA de los niveles solubles en pacientes con AP. Sin embargo, *MIF* difiere en este comportamiento, puesto que la expresión de *MIF* fue mayor en SC, mientras que los niveles solubles aumentan en pacientes con AP. Cabe mencionar que el análisis de la expresión de *MIF*, no ha sido descrito por otros autores, por lo que este estudio significaría uno de los primeros en ser reportado.

Se analizó el comportamiento en la expresión de ambas citocinas, utilizando correlaciones entre las características clínicas de pacientes con AP. En la mayoría de las variables se observó un comportamiento que sugiere que cuando  $TNF-\alpha$  presenta un aumento en su expresión, *MIF* muestra una tendencia a disminuir y viceversa. Por otro lado se determinaron los coeficientes de las correlaciones de los niveles solubles de  $TNF-\alpha$  y *MIF* con las características clínicas de interés, en este caso la mayoría de las variables no mostraron significancia, excepto la variable DAS28 en la que se observa significancia, lo que se traduce en que existe una asociación de  $TNF-\alpha$  con la actividad clínica.

Estos resultados sugieren que  $TNF-\alpha$  se asocia con AP, y se requieren más estudios para poder revelar el papel de *MIF* en esta enfermedad.

## ANEXOS

### Anexo 1.- Índice de Actividad DAS28.

Para calcular el índice DAS, se toma en cuenta: la velocidad de sedimentación globular (como reactante de fase aguda); la escala análoga visual; el número de articulaciones inflamadas y el número de articulaciones dolorosas (índice articular tomando en cuenta 28 articulaciones).

Para el cálculo se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{DAS28} = 0.56 * \text{sqrt}(\text{dolorosas28}) + 0.28 * \text{sqrt}(\text{inflamadas28}) + 0.70 * \ln(\text{VSG}) + 0.014 * \text{Escala análoga visual}$$

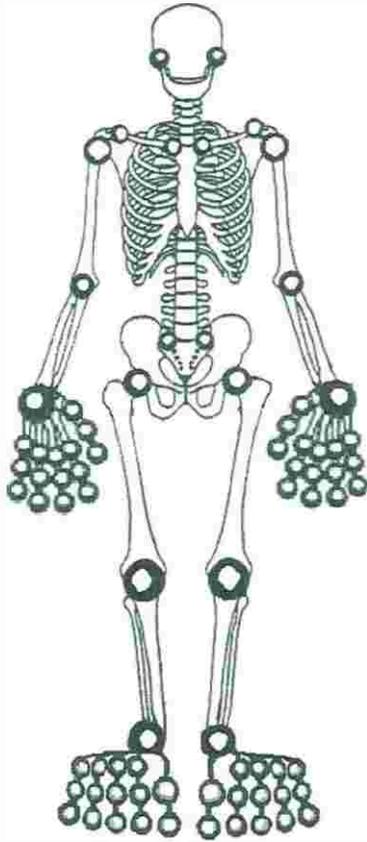
El cálculo puede realizarse mediante una hoja de Excel programada o utilizando un *web calculator*.

Cuadro 12. Escala análoga visual

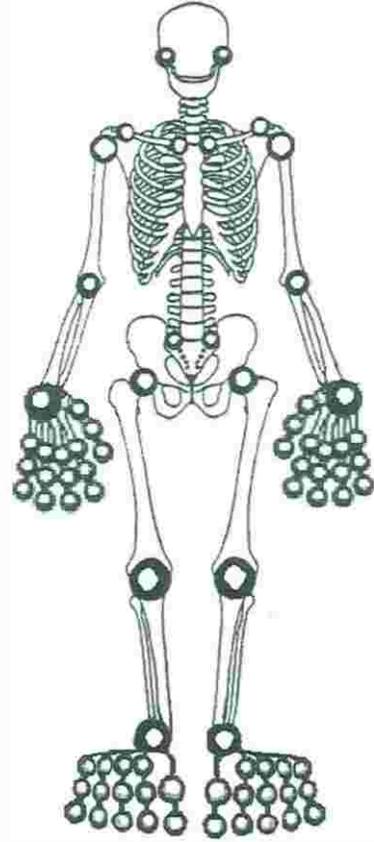
NOMBRE DEL PACIENTE: _____										
Fecha _____										
<b>ESCALA ANALOGA VISUAL DEL MÉDICO</b>										
<b>ESTADO DE SALUD EN GENERAL:</b>										
Por favor marque en esta escala el número que corresponda a su estado de salud en general.										
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----										
Muy bien					Regular					Muy mal

																									
<p><b>DOLOR:</b></p> <p>Por favor marque en esta escala el número que corresponda a su dolor.</p>																									
<table style="margin: auto;"> <tr> <td style="text-align: center;">0</td><td style="text-align: center;">1</td><td style="text-align: center;">2</td><td style="text-align: center;">3</td><td style="text-align: center;">4</td><td style="text-align: center;">5</td><td style="text-align: center;">6</td><td style="text-align: center;">7</td><td style="text-align: center;">8</td><td style="text-align: center;">9</td><td style="text-align: center;">10</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;"> ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Sin dolor</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td style="text-align: center;">con dolor</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td style="text-align: center;">dolor insoportable</td> </tr> </table>	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----			Sin dolor					con dolor					dolor insoportable
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10															
----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----																									
Sin dolor					con dolor					dolor insoportable															
<p>Nombre y firma del médico: _____</p>																									

<p><i>INDICE ARTICULAR DEL PACIENTE</i></p>	
<p>Nombre del paciente _____ Registro _____</p>	
<p><b>Rellene con pluma los círculos que representan las articulaciones afectadas</b></p>	
<p><b>INFLAMACIÓN</b></p>	<p><b>DOLOR</b></p>



No. Total de articulaciones  
inflamadas \_\_\_\_\_



No. Total de articulaciones  
con dolor \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Firma del médico: \_\_\_\_\_

## Anexo 2. Consentimiento Informado

Análisis de la expresión del mRNA y niveles solubles de TNF- $\alpha$  y MIF en artritis psoriásica

Número de registro: \_\_\_\_\_

Institución: Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas, CUCS U de G, Instituto Dermatológico de Jalisco "Dr. José Barba Rubio", Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde"

Nombre del paciente:

\_\_\_\_\_

### 1. NATURALEZA Y PROPÓSITO DE ESTE ESTUDIO

Se la ha invitado a que participe en este estudio de investigación, ya que padece de artritis psoriásica. Este estudio se está llevando a cabo para tratar de identificar si existe asociación de la expresión de mRNA y niveles solubles de TNF- $\alpha$  y MIF en artritis psoriásica.

Antes de que usted decida ser voluntario(a) en este estudio, usted debe leer esta forma. Esta forma se llama consentimiento informado y explica el estudio. Por favor haga todas las preguntas que sean necesarias para que pueda así decidir si desea participar o no en este estudio.

Debido a que se trata de un procedimiento en el que se someterá a un procedimiento invasivo debe saber que: se hará una valoración clínica completa y revisión articular, se tomara muestras de sangre en donde se extraerá RNA total para cuantificar la expresión de *MIF* y *TNFA*

Se toma en la misma punción muestra para medir niveles séricos de proteína C reactiva, factor de necrosis tumoral alfa, y niveles séricos de la proteína llamada "factor inhibidor de la migración de macrófagos" que consideramos son importantes en el desarrollo de su enfermedad.

## 2. EXPLICACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS A SEGUIR

Una vez que acepte participar en este estudio se le hará una punción venosa para obtener sangre previa valoración clínica.

## 3. POSIBLES EFECTOS SECUNDARIOS.

### A. EFECTOS SECUNDARIOS

No se han reportado efectos adversos relacionados con la toma de sangre además de posibles moretones

## 4. POSIBLES BENEFICIOS DURANTE EL ESTUDIO

Todas las pruebas, exámenes y cuidados médicos que son parte de este estudio le serán proporcionados sin ningún costo. Usted y otras personas pueden verse beneficiadas con las conclusiones generales que se obtendrán de los resultados de este estudio. De igual forma, entiendo que someteré aun proceso de investigación científica por lo que ningún resultado final puede verse asegurado.

## 5. DERECHO A RETIRARSE DE ESTE ESTUDIO

Es su decisión formar parte de este estudio. Usted puede elegir no participar o abandonar el estudio no resultará en alguna multa o pérdida de beneficios médicos o afectará su tratamiento médico en el futuro.

## 6. OFRECIMIENTO PARA RESPONDER PREGUNTAS ACERCA DE ESTE ESTUDIO

Usted deberá hacer preguntas de cualquier cosa que no comprenda antes de firmar ésta forma. El grupo de médicos del estudio también estará disponible para contestar cualquier pregunta antes, durante y después del estudio.

## 7. CONFIDENCIALIDAD

La información que se obtenga de su participación en el estudio se mantendrá en forma confidencial y su identidad no será revelada. Los resultados de su tratamiento incluyendo pruebas de laboratorio, fotografías, radiografías y ecografías pueden ser publicados con propósitos científicos sin que su identidad sea revelada.

## 8. CONSENTIMIENTO

He leído o me han leído esta forma de consentimiento informado la cuál describe el propósito y naturaleza de este estudio. He tenido tiempo para revisar esta información y se me ha brindado una oportunidad para hacer preguntas. He recibido respuestas que satisfacen plenamente mis preguntas. Si no participo o si interrumpo mi participación en este estudio, no perderé ningún beneficio. No perderé ninguno de mis derechos legales si interrumpo mi participación. Mi participación en este estudio es completamente voluntaria

Nombre \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_ participante

Firma del participante \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_ testigo

Firma del testigo \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Relación con el sujeto de investigación: \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_ testigo

Firma del testigo \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Relación con el sujeto de investigación: \_\_\_\_\_

Nombre \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_ investigador  
responsable \_\_\_\_\_

Firma del investigador responsable \_\_\_\_\_

**Anexo 3. Historia Clínica**

Análisis de la expresión del mRNA y niveles solubles de TNF- $\alpha$  y MIF en  
artritis psoriásica

Nombre del  
paciente \_\_\_\_\_

—

Fecha \_\_\_\_\_ Registro \_\_\_\_\_

—

Edad \_\_\_\_\_ Fecha de  
nacimiento \_\_\_\_\_

Domicilio \_\_\_\_\_

—

Teléfono \_\_\_\_\_

AHF:

DM: \_\_\_\_\_ HTA \_\_\_\_\_ EVC \_\_\_\_\_ IAM \_\_\_\_\_  
\_TB \_\_\_\_\_

Tiroides \_\_\_\_\_ Cancer \_\_\_\_\_ Otros: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

APNP:

Paciente L.N: \_\_\_\_\_ LR: \_\_\_\_\_

Padres: Padre L.N: \_\_\_\_\_ LR: \_\_\_\_\_

Madre L.N \_\_\_\_\_ LR \_\_\_\_\_

Abuelos:

Abuelo Paterno L.N.: \_\_\_\_\_ L.R. \_\_\_\_\_

Abuela Paterna L.N.: \_\_\_\_\_ L.R. \_\_\_\_\_

Abuelo Materno L.N.: \_\_\_\_\_ L.R. \_\_\_\_\_

Abuela Materno L.N.: \_\_\_\_\_ L.R. \_\_\_\_\_

Oficio: \_\_\_\_\_ SS: \_\_\_\_\_ Estado

Civil \_\_\_\_\_ Esc: \_\_\_\_\_ Relig. \_\_\_\_\_

Dieta \_\_\_\_\_

Ejercicio \_\_\_\_\_ Tabaquismo \_\_\_\_\_ Alcoholismo

\_\_\_\_\_ Drogas ilícitas \_\_\_\_\_

Hemotipo \_\_\_\_\_ Otros \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

APP:

DM \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ HTA \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Qx \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Alergicos \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Transfusiones \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Otros: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Psoriasis: Tipo \_\_\_\_\_ Dx \_\_\_\_\_ % de afección

\_\_\_\_\_

Cuadrantes afectados en

uñas \_\_\_\_\_

Tx \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

AGO:

FUM \_\_\_\_\_ G \_\_\_\_\_ P \_\_\_\_\_ A \_\_\_\_\_ C \_\_\_\_\_

DOC \_\_\_\_\_

Mamografía \_\_\_\_\_ THR \_\_\_\_\_ MPF \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Otros medicamentos

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

PEPA:

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

---

---

---

---

---

IAS:

---

---

---

---

---

---

E.F:

Peso: \_\_\_\_\_ Talla: \_\_\_\_\_ TA \_\_\_\_\_ FC \_\_\_\_\_ FR \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_ Temp: \_\_\_\_\_

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Criterios CASPAR

Criterio	Valor	Presente
Evidencia de psoriasis actual, historia personal de psoriasis, o historia familiar de psoriasis	2 puntos	
Distrofia ungueal psoriásica típica que incluye onicólisis, lesiones punteadas, e hiper-queratosis observados en el examen físico actual	1 punto	
Un resultado negativo del factor reumatoide por cualquier método, excepto látex.	1 punto	
Presencia de dactilitis, definida como la inflamación total de un dedo, o una historia de dactilitis registrada por un reumatólogo.	1 punto	
Evidencia radiográfica de neo formación ósea yuxta-articular que aparece como osificación mal definida cerca de los márgenes de articulación en las radiografías simples de mano o pie.	1 punto	

Laboratorio: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

RX \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Otros: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Tratamiento: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## REFERENCIAS

1. Anaya, J. M., (2003), Descripción Molecular del TNF- $\alpha$ , *Reumatología* 2003; 19(2):112-120
2. Boehncke, W. H., Boehncke, S., (2014). More than skin-deep: the many dimensions of the psoriatic disease. *SwissMed. Wkly.* (144), w13968. doi:10.4414/smw.2014.13968
3. Calandra, T., Roger, T., (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3(10):791–800. doi:10.1038/nri1200
4. Cañete J. D., (2012), Biopatología de la membrana sinovial en la artritis psoriásica. *Reumatol. Clin.* 2012;8(S1):S10–S14 doi:10.1016/j.reuma.2011.12.006.
5. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159.
6. Collantes, E., Fernández Sueiro, J.L., García-Vicuña, R., Gratacós, J., Mulero, J., Muñoz Fernández, S., Sanmartí, R., Zarco, P., Abad, M.A., Battle, E., Cañete, J. D., González Crespo, M.R., González, C., Juanola, X., Sanz, J., Rivera, J., (2007). Actualización del Consenso de la Sociedad Española de Reumatología sobre el uso de antagonistas del TNF- $\alpha$  en las espondiloartritis, incluida la artritis psoriásica. *Reumatol. Clin.* 3 Suppl (2), S60–70. doi:10.1016/S1699-258X(07)73645-8
7. Cutolo M., Capellino S., Sulli A., Seroli B., Secchi M. E., Villaggio B., and Straub R. H., (2006), Estrogens and Autoimmune Diseases, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1089:538–547(2006) doi:10.1196/annals.1386.043.
8. Danning, C. L., Ilei, G. G., Hitchon, C. Greer, M.R. Boumpas, D. T. and McInnes. I. B., (2000). [ Macrophage-derived cytokine and nuclear factor kb p65 expression in synovial membrane and skin of patients

- with psoriatic arthritis] *Arthritis & Rheumatism* (Vol. 43), No. 6, pp 1244–1256
9. Damico R., Simms T., Kim B. S., Tekeste Z., Amankwan H., Damarla M., and Hassoun P. M., (2009), p53 Mediates Cigarette Smoke–Induced Apoptosis of Pulmonary Endothelial Cells Inhibitory Effects of Macrophage Migration Inhibitor Factor, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Vol 44). Pp 323–332, 2011, doi:10.1165/rcmb.2009-0379OC.
  10. De Los Rios J. A., Sahuquillo S.; Merino M. A.; Poca M. A. y Expósito L., (2009), Microdiálisis de alta resolución. Aspectos metodológicos y aplicación al estudio de la respuesta inflamatoria cerebral. *Eurocirugía* 2009; (20):433-448.
  11. Denkinger, C.M., Metz, C., Fingerle-Rowson, G., Denkinger, M.D., Forsthuber, T. G., (2004). Macrophage migration inhibitory factor and its role in autoimmune diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* (52), 389–400 [http://www.aite-online/pdf/vol\\_52/no\\_6/6558.pdf](http://www.aite-online/pdf/vol_52/no_6/6558.pdf).
  12. Donn, R. P., Plant, D., Jury, F., Richards, H. L., Worthington, J., Ray, D. W., Griffiths, C.E.M., (2004). Macrophage migration inhibitory factor gene polymorphism is associated with psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 123, 484–487. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23314.x
  13. Eder, L., Law, T., Chandran, V., Shanmugarajah, S., Shen, H., Rosen, C.F., Cook, R.J., Gladman, D.D., (2011). Association between environmental factors and onset of psoriatic arthritis in patients with psoriasis. *Arthritis Care Res.* (63), 1091–1097. doi:10.1002/acr.20496
  14. Firestein, G. S., Budd, R., Gabriel, S. E., O'Dell, J. R., McInnes, I. B., 2012. *Kelley's Textbook of Rheumatology: Expert Consult Premium 7<sup>th</sup> Edition: Enhanced Online Features*. Elsevier Health Sciences. ELSEVIER SAUNDERS, Philadelphia, Pennsylvania 19106
  15. FitzGerald, O., Helliwell, P., Mease, P., Mumtaz, A., Coates, L., Pedersen, R., Nab, H., Molta, C., (2012). Application of composite disease activity scores in psoriatic arthritis to the PRESTA data set.

Ann. Rheum. Dis. 71, 358–362. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200093

16. Fragoso Lona, J.M., Sierra Martínez, M., Vargas Alarcón, G., Barrios Rodas, A., Ramírez Bello, J., (2013). Tumor necrosis factor alfa in cardiovascular diseases: molecular biology and genetics. *Gac. Médica México*,(149), 521–530.
17. González, S., Queiro, R., Ballina, J., (2012). [Update in the pathogenesis of psoriatic arthritis]. *Reumatol. Clin.* 8 Suppl 1, S1–6. doi:10.1016/j.reuma.2011.12.003
18. Kinahan C. E., Mazloom S. and Fernandez A. P., (2014), Impact of smoking on response to systemic treatment in patients with psoriasis: a retrospective case–control study, *British Journal of Dermatology* (2015)(172),pp428–436, doi 10.1111/bjd.13359.
19. Krueger, G., Callis, K., (2004). Potential of tumor necrosis factor inhibitors in psoriasis and psoriatic arthritis. *Arch. Dermatol.* (140), 218–225. doi:10.1001/archderm.140.2.218
20. Larson D. F. and Horak K., (2006), Macrophage migration inhibitory factor: controller of systemic inflammation, *Critical Care*2006, (10):138 (doi:10.1186/cc4899).
21. Leng, L., Metz, C. N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R.A., Bucala, R., (2003). MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J. Exp. Med.* (197), 1467–1476. doi:10.1084/jem.20030286
22. Llamas-Covarrubias, M. A., Valle, Y., Bucala, R., Navarro-Hernández, R. E., Palafox-Sánchez, C. A., Padilla-Gutiérrez, J. R., Parra-Rojas, I., Bernard-Medina, A. G., Reyes-Castillo, Z., Muñoz-Valle, J. F., (2013). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): genetic evidence for participation in early onset and early stage rheumatoid arthritis. *ELSEVIER, Cytokine* (61), 759–765. doi:10.1016/j.cyto.2012.12.032

23. Livak K. J, Schmittgen T. D. (2001), Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. (4):402-8.
24. MacEwan, D. J., (2002). TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell. Signal.* (14), 477–492. doi S0898-6568(01)00262-5
25. Moll J. M. H. and Wright V., (1973), Psoriatic Arthritis Seminars in Arthritis and Rheumatism. 3(1):55-78.
26. Nograles, K.E., Davidovici, B., Krueger, J.G., (2010). New insights in the immunologic basis of psoriasis. *Semin. Cutan. Med. Surg.* (29), 3–9. doi:10.1016/j.sder.2010.03.001
27. O'Rielly D. D., Rahman P., (2011), Genetic of Suceptibility and Treatment response in psoriatic arthritis, *Nat. Rev. Rheumatology* (7), 718-732, doi: 10.1038/nrrheum.2011.169
28. Probert L., Eugster H. P., Akassoglou K., Bauer J., Frei K., Lassmann H. and Fontana A., (2000), TNFR1 signalling is critical for the development of demyelination and the limitation of T-cell responses during immune-mediated CNS disease, *Brain* (2000),123,2005–2019 <http://brain.oxfordjournals.org/>.
29. Rahman P., Elder J. T., (2005), Genetic epidemiology of psoriasis and psoriatic arthritis, *Ann Rheum Dis* 2005;(64)(Suppl11):ii37–ii39. doi:10.1136/ard.2004.030775.
30. Renner, P., Roger, T., Calandra, T., (2005). Macrophage migration inhibitory factor: gene polymorphisms and susceptibility to inflammatory diseases. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* (41) Suppl 7, S513–519. doi:10.1086/432009
31. Reveille, J.D., (2012). Genetics of spondyloarthritis—beyond the MHC. *Nat. Rev. Rheumatol.* (8), 296–304. doi:10.1038/nrrheum.2012.41

32. Roberson E. y Bowcock A. M., (2010), Psoriasis genetics: breaking the barrier, *Trends Genet.* 2010 September; 26(9): 415–423. doi:10.1016/j.tig.2010.06.006.
33. Sankowski, A. J., Lebkowska, U. M., Cwikla, J., Walecka, I., Walecki, J., (2013). Psoriatic arthritis. *Poi. J. Radiol.* (78), 7–17. doi:10.12659/PJR.883763
34. Setty, A. R., Choi, H. K., (2007). Psoriatic arthritis epidemiology. *Curr. Rheumatol. Rep.* (9), 449–454.
35. Shimizu T., Nishihira J., Mizue Y., Nakamura H., Abe R., Watanabe H., Ohkawara A, Shimizu H., (2001), High Macrophage migration inhibitory factor (MIF) serum levels associated with extended psoriasis. *The Society for Investigative Dermatology.*
36. Taylor, W., Gladman, D., Helliwell, P., Marchesoni, A., Mease, P., Mielants, H., CASPAR Study Group, (2006). Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. *Arthritis Rheum.* (54), 2665–2673. doi:10.1002/art.21972
37. Veale, D.J., Ritchlin, C., FitzGerald, O., (2005). Immunopathology of psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* (64) Suppl 2, ii26–29. doi:10.1136/ard.2004.031740
38. Wang C., Akalu Y. T., Suarez-Farinas M., Gonzalez J., Mitsui H., Lowes M. A., Orlow S. J., Manga P., and Krueger J. G., (2013), L-17 and TNF synergistically modulate cytokine expression while suppressing melanogenesis: potential relevance to psoriasis, *J Invest Dermatol.* 2013 December; 133(12): doi:10.1038/jid.2013.237.
39. Warr G. A. and Russell Martin R., (1973), In Vitro Migration of Human Alveolar Macrophages: Effects of Cigarette Smoking. *Infection and Immunity*, aug.1973, (Vol.8),No.2. p.222-227.
40. Weigle, N., McBane, S., (2013). Psoriasis. *Am. Fam. Physician* (87), 626–633.

41. Wijbrandts A., van Leuven S., Boom H., Gerlag D. , Stroes E., Kastelein J., Tak P., (2008), Sustained changes in lipid profile and macrophage migration inhibitory factor levels after anti-tumour necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2009;(68): 1316–1321. doi:10.1136/ard.2007.086728.