



EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA DICKKOPF- 1 (DKK-1) Y SU ASOCIACIÓN CON ÍNDICES DE ACTIVIDAD CLÍNICA REUMÁTICA EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE TEMPRANA

ESTUDIANTE ANGELA MIYARED ARIAS ARIAS

ASESOR EXTERNO

MARÍA CONSUELO ROMERO SÁNCHEZ, MSc, PhD.

LEIDY LORENA CHILA MORENO, Bcl, est. MSc.

ASESOR INTERNO JANETH NAVARRETE. MSc

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA SALUD PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO BOGOTÁ D.C., MAYO DE 2018

DEDICATORIA

A mi mama por su constancia, comprensión y apoyo incondicional en cada momento, mi hermano Jhon Harol por su paciencia, a mi compañero Alejandro Ramos por su ayuda y aliento, a mi amiga y compañera Francy por su compañía y ayuda en este proceso.

Angela A. A.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesora de tesis Maria Consuelo Romero, por su esfuerzo, tiempo, paciencia y apoyo en cada etapa que hicieron posible culminar este proyecto; a Lorena Chila Moreno por su oportuna disposición y ayuda, a la profesora Jeannette Navarrete por su orientación durante el desarrollo de este proceso.

Agradezco a Dios por permitirme llegar a este día tan especial, por los triunfos, derrotas y momentos difíciles que me han enseñado a valorar cada día más.

A mi mama por su valentía aun cuando se creía todo perdido, por ser mi guía y compañera incondicional en cada paso, por instruirme con los mejores valores y enseñanzas en cada una de las etapas de mi vida, te doy gracias por celebrar cada triunfo y logro conmigo, por tu apoyo en los momentos que me creí derrotada, le agradezco a Dios por tu presencia en mi vida.

A mi hermano Jhon Haron por su paciencia y por creer en mis capacidades

A la familia Aguiar-Quintero por sus oraciones y compañía en momentos sombríos, gracias por darme fortaleza cuando lo necesite.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	10
1. OBJETIVOS.....	12
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	12
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
ANTECEDENTES.....	13
2. MARCO TEÓRICO.....	19
6.1 ARTRITIS REUMATOIDE.....	19
6.2 BIOMARCADORES ASOCIADOS A ENFERMEDAD.....	20
6.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	25
6.3.1 EROSIONES OSEAS EN ARTRITIS REUMATOIDE.....	25
6.4 VÍA Wnt.....	28
6.4.1 LA VÍA CANÓNICA.....	29
6.4.2 VÍA NO CANÓNICA.....	30
6.5 PROTEÍNA DICKKOPF-1 (DKK-1).....	31
6.6 RELACIÓN ENTRE NIVELES DE DKK1 Y DESENLACES EN AR.....	32
3. METODOLOGÍA.....	34
7.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	34
7.2 POBLACIÓN.....	34
7.3 MUESTRA.....	34
7.4 SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	34
7.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	35
7.6 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	35
7.7 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS.....	35
7.8 ASPECTOS ÉTICOS.....	37
4. RESULTADOS.....	38
5. DISCUSIÓN.....	57
6. CONCLUSIONES.....	59
7. REFERENCIAS.....	65
ÍNDICE DE FIGURAS	

Figura 1 Autoanticuerpos y osteoclastogénesis. Figura tomada de Schett G and Gravallesse E. Nat Rev Rheumatol 2012; 8(11): 656–664 30

Figura 2 Interacción entre la inflamación y daño óseo Figura tomada de Schett G and Gravallesse E. Nat Rev Rheumatol 2012; 8(11): 656–664 30

Figura 3 Vía canónica de señalización Wnt. Figura tomada Rodrigo Giraldo B, Ana María Santos y John Londoño. REV COLOMB R EUMATOL. 2015;22(2):119–125 32



EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE LA PROTEÍNA DICKKOPF- 1 (DKK-1) Y SU ASOCIACIÓN CON ÍNDICES DE ACTIVIDAD CLÍNICA REUMÁTICA EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE TEMPRANA

RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad de naturaleza autoinmune sistémica, se caracteriza por un estado de inflamación crónico, discapacidad progresiva, daño osteoarticular y consecuencias socioeconómicas de gran impacto en la calidad de vida del paciente. La determinación de la AR en etapas tempranas de la enfermedad puede predecir desenlaces del trastorno y así disminuir daños irreversibles. La EULAR/ACR establecieron en el año 2010 una serie de criterios clínicos clasificatorios y pruebas de laboratorio que incluyen el Factor Reumatoide (FR) y los anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (anti-CCP), los cuales están asociados a la actividad de la enfermedad y al pronóstico de la misma.

La identificación de nuevos biomarcadores que puedan asociarse a manifestaciones en estadios tempranos de la enfermedad ha cobrado gran interés, ya que hay pacientes que presentan niveles muy bajos o indetectables de FR y anti-CCP aun así presentando un elevado daño articular, dificultando el diagnóstico y las posibles opciones terapéuticas. La proteína Dickkopf-1 (DKK-1) es un regulador de la masa ósea y remodelación articular, se ha evidenciado su aumento a nivel sérico en presencia de resorción ósea, asociándose a un elevado valor predictivo en el desarrollo y severidad de la enfermedad.

En el presente estudio se pretende establecer los niveles de la proteína DKK-1 en pacientes con diagnóstico de AR temprana y su asociación con índices de actividad clínica reumática, con el fin de determinar las condiciones que asocian la presencia de la DKK-1 y sus posibles capacidades de pronóstico durante el curso de la enfermedad.

Palabras claves: artritis reumatoide, proteína DKK-1

Estudiante: Angela Miyared Arias Arias

Docentes: Maria Consuelo Romero Sanchez, Lorena Chila Moreno, Jeannette Navarrete

Fecha: Marzo 16 de 2018

INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad de naturaleza autoinmune con complicaciones sistémicas, que está relacionada con la inflamación e hiperplasia de la membrana sinovial, conduciendo a la destrucción articular (1). La interacción entre factores genéticos y ambientales puede coadyuvar al desenlace de la enfermedad, donde su prevalencia a nivel mundial se ha estimado alrededor del 0.5 al 1.0% de la población adulta (2, 3).

El diagnóstico de la AR temprana presenta varias dificultades, ya que los criterios clínicos son deficientes en la fase inicial de la enfermedad. Antes de 1990 la prueba de laboratorio empleada para ayudar al diagnóstico fue el factor reumatoide (FR), sin embargo el FR se puede encontrar de un 70-80% de los pacientes con AR y también puede ser detectado en otras enfermedades autoinmunes e infecciosas y en individuos sanos hasta en un 15% (4). Igualmente se han descrito reactantes de fase aguda como la velocidad de sedimentación globular (VSG) y la proteína C reactiva (PCR), no obstante estos no son específicos de la enfermedad ya que son marcadores comunes de inflamación (5)

Recientemente la determinación de un elevado porcentaje de pacientes con AR que presentaban autoanticuerpos como los anti-CCP, los cuales han cobrado gran importancia como apoyo diagnóstico de la AR, debido a su presencia en etapas tempranas de la enfermedad, antes de que se detecten niveles de FR, por lo cual se ha relacionado la presencia de anti-CCP en pacientes con AR con una alta actividad clínica y mayor daño osteoarticular (4, 6).

Por otra parte, se ha descrito la presencia de autoanticuerpos que anteceden la aparición de los anticuerpos anti-CCP indicando así la existencia de marcadores más tempranos de la lesión articular, estos autoanticuerpos son conocidos como

anticuerpos anti-proteínas carbamiladas (anti-Carp) y se han asociado en pacientes que presentan anticuerpos anti-CCP positivos y pacientes anti-CCP negativos (7).

En hallazgos recientes se han encontrado mecanismos patogénicos relacionados con la pérdida ósea, como es el caso de la proteína Dickkopf-1 (DKK-1), debido a que se han encontrado niveles elevados en suero del marcador DKK-1 en patologías asociadas con resorción ósea como la AR (8). Este hallazgo podría considerarse a la proteína DKK-1 como un nuevo biomarcador que permita realizar un pronóstico preciso de la enfermedad en pacientes con AR que presenten niveles elevados de DKK-1 en suero, y así poder determinar opciones terapéuticas propicias y el pronóstico en individuos que tengan diagnóstico de AR temprana.

1. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los niveles de la proteína Dickkopf-1 (DKK-1) sérica y su asociación con índices de actividad reumática en pacientes con artritis reumatoide temprana.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la asociación entre el nivel de DKK-1 en suero y su relación con índices de actividad reumática en pacientes con AR temprana.
- Determinar el nivel de asociación entre el nivel de DKK-1 en suero con niveles de auto anticuerpos como anti-proteínas citrulinadas (anti CCP) y factor reumatoide además de proteínas de fase aguda en pacientes con AR temprana.
- Establecer los niveles de DKK-1 en suero en pacientes con AR temprana, por medio del ensayo inmunoenzimático ELISA.

ANTECEDENTES

Actualmente se desconoce la etiología de la AR, sin embargo autores indican que la exposición a los factores genéticos o ambientales podría coadyuvar al desarrollo de enfermedades extra-articulares. Hay estudios que proponen el tabaquismo, como factor causal en el inicio y mantenimiento de la respuesta inflamatoria autoinmune que se da en la AR (9). Por lo tanto, la determinación precoz de la enfermedad y el inicio pertinente de los tratamientos, son esenciales para limitar el daño articular y así proporcionar un mayor grado de funcionalidad en los pacientes (4).

La necesidad de evaluar biomarcadores tempranos en la AR se ha considerado esencial para limitar el daño articular causado en los pacientes. En la actualidad se han estudiado varios biomarcadores biológicos que van desde autoanticuerpos, marcadores genéticos, marcadores de expresión génica, citoquinas, factores de crecimiento, reactantes de fase aguda, anomalías del tejido sinovial determinado por inmunohistoquímica y progresión radiológica. El origen de estos biomarcadores puede ser de sangre, suero, plasma, orina, líquido sinovial o tejido sinovial (6).

La revisión realizado por Angela Mc Ardle et al, describieron diferentes biomarcadores como las proteínas citrulinadas, factor reumatoide, calprotectina, metaloproteinasas de matriz, la degradación de colágeno, marcadores de angiogénesis y las adipocinas, los cuales serían importantes en la predicción de la destrucción articular en la enfermedad y en las fases posteriores al diagnóstico de la misma (10).

El diagnóstico de la AR temprana presenta varias dificultades, ya que los criterios clínicos son deficientes en la fase inicial de la enfermedad. La prueba de laboratorio

empleada para ayudar al diagnóstico fue el factor reumatoide (FR), sin embargo el FR se puede encontrar de un 70-80% de los pacientes con AR y también puede ser detectado en otras enfermedades autoinmunes e infecciosas y en individuos sanos hasta en un 15%. Por lo tanto, no presenta un alto grado de especificidad lo que no lo hace idóneo en el momento de dictar un pronóstico de la misma (4).

También se han descritos los reactantes de fase aguda, tales como el aumento de la velocidad de sedimentación globular (VSG), la proteína C-reactiva (PCR) y la fase aguda amiloide sérico A (A-SAA), considerándolos importantes en el diagnóstico de la AR. No obstante la PCR y la VSG no son específicas de la enfermedad debido a que son marcadores comunes de inflamación, por lo que es necesario tener biomarcadores que expresen más sensibilidad (5, 10).

Sin embargo, marcadores como la calprotectina se han identificado por presentar mayor sensibilidad frente a la actividad de la enfermedad a diferencia de la VSG y la PCR, ya que indica la inflamación de la membrana sinovial y no la producción de inflamación sistémica. García-Arias y sus colegas en 2013 concluyeron que los niveles de calprotectina se correlacionan con la valoración clínica y de laboratorio, y a su vez se refleja una disminución de este en respuesta al tratamiento, sugiriendo la calprotectina como un biomarcador de seguimiento en etapas posteriores de la enfermedad (11).

Schelleken y colaboradores en 1998, determinaron la presencia de un elevado porcentaje de pacientes con AR que presentaban un anticuerpo específico contra péptidos sintéticos que contienen el aminoácido citrulina, un residuo de arginina el cual es modificado postraduccionalmente, los cuales se encontraban en los sueros de pacientes con AR. Estos se pudieron detectar mediante la utilización de una ELISA, donde el 76% de los sueros de pacientes con AR presentaban los anticuerpos con una especificidad del 96% (4).

Por lo anterior, el anticuerpo anti-CCP es un marcador biológico, con la capacidad de detección de la AR en un fase temprana, mucho antes de la manifestación de los signos clínicos típicos de la enfermedad (6).

En estudios previos, Aho et al, en 1985, se centraron en las primeras fases de la AR, ya que la patogénesis de la enfermedad se ha correlacionado con factores genéticos del huésped, la lesión tisular mediada por complejos inmunes y el agente iniciador de la misma. Por lo cual se ha observado como respuesta humoral característica antes del inicio de la enfermedad es la presencia del factor reumatoide (FR) (12), anticuerpos contra pépticos cíclicos citrulinados y reactantes de fase aguda (13). Manifestándose niveles de factor reumatoide (FR) de IgM, IgG e IgA (14), así como los anticuerpos contra péptidos citrulinados, los cuales anteceden a la aparición de la AR. Expresando un elevado valor predictivo para los anticuerpos anti-CCP en estadíos tempranos del desarrollo de la AR (13).

Posteriormente en 2004 Ewa Berglin et al.,. Mediante un estudio de casos y cohortes analizaron factores genéticos que preceden la enfermedad, determinando la presencia del epítipo compartido (EC), definido como HLA-DRB1 *0404 o DRB1 *0401, los anticuerpos anti-CCP y el factor reumatoide (FR), en individuos que posteriormente desarrollaron AR. Los autores concluyeron que la existencia del EC y los anticuerpos anti-CCP en combinación predijeron significativamente la AR, en comparación con los anticuerpos anti-CCP sin el EC o el EC sin los anticuerpos antiCCP. Lo que demostró que la presencia de anticuerpos anti-CCP en compañía del gen EC se asocian con un elevado riesgo de evolucionar posteriormente en una AR (13).

Por otra parte, se ha descrito la presencia de autoanticuerpos que anteceden la aparición de los anticuerpos anti-CCP indicando así la existencia de marcadores más tempranos de la daño articular, estos autoanticuerpos son conocidos como anticuerpos anti-proteínas carbamiladas (anti-Carp) y se han asociado en pacientes que presentan anticuerpos anti-CCP positivos y pacientes anti-CCP negativos (7).

Los anticuerpos anti-Carp se presentan debido a una reacción no enzimática mediada por cianato la cual modifica los residuos de lisina en homocitrulina, mediante la adición de un grupo carbamilo a los residuos. Es habitual que el cianato se encuentre en equilibrio de con la urea pero en procesos de inflamación pueden ocasionar un desequilibrio mediante un mecanismos de mieloperoxidasa lo cual conduce al aumento de los niveles de cianato, desarrollando de este modo el grado de carbamitación (15).

Los anticuerpos anti-CarP no se han relacionado con factores genéticos o ambientales como el HLA -epítipo compartido (EC) y el tabaquismo, respectivamente (15). No obstante se han encontrado niveles elevados en suero de anti-CarP en pacientes con anticuerpos anti-CCP negativos con AR y donde se evidencio una asociación en el aumento de la progresión radiográfica y destrucción articular grave. Asimismo los anti-CarP se encuentran en sueros de pacientes mucho antes de la presentación clínica de la enfermedad y también se ha identificado en familiares sanos de primer grado de consanguinidad de pacientes con AR (15).

En relación con lo anterior hay estudios que señalan a los anti-Carp como posibles marcadores para el diagnóstico temprano de la AR, siempre que se realicen en combinación con los anticuerpos antipeptidos citrulinados, los cuales podrían ayudar a detectar la actividad temprana de la enfermedad en los pacientes que presentan artritis indiferenciada que posteriormente evolucionaran a artritis reumatoide (7, 16).

Después de lo expuesto anteriormente, se puede evidenciar que la progresión de la AR está condicionada con factores genéticos y ambientales que pueden desencadenar la enfermedad o aumentar su severidad, por lo tanto se ha evaluado otros mecanismos fisiopatológicos que conllevan al desarrollo de la erosión ósea. Actualmente el mejor predictor de la AR temprana se hace mediante evaluaciones radiográficas de la presencia de erosión ósea, sin embargo el uso de biomarcadores

predictivos que expresen la progresión estructural de la enfermedad son muy restringidos en la práctica clínica (7).

En hallazgos recientes se han encontrado mecanismos patogénicos relacionados con la pérdida ósea, como es el caso de la proteína Dickkopf-1 (DKK-1), debido a que se han encontrado niveles elevados en suero del marcador DKK-1 en patologías asociadas con resorción ósea como la AR (7).

La revisión realizada por Daoussi y Andonopoulos en 2011, sobre el rol emergente de Dickkopf-1 en la biología ósea: como el factor principal que controla la remodelación ósea y articular, se evidencio un aumento en los niveles de DKK-1 en relación con disminución de la densidad ósea, igualmente se ha relacionado con procesos de remodelación del hueso en la AR y la espondilitis anquilosante. Debido a que cumple un papel importante en la regulación de la masa ósea y la remodelación articular este podría convertirse en un blanco terapéutico de la enfermedad (17).

Un estudio realizado por Raphaèle Seror y colegas en 2016, determinan los niveles séricos de la proteína Dickkopf-1 (DKK-1) y esclerostina (SOST) en pacientes con AR temprana, donde los autores concluyen que la presencia de la proteína DKK-1 se encuentra aumentada en pacientes con AR con 2 años de evolución de la enfermedad sin progresión radiológica, sugiriendo que la proteína DKK-1 podría ser un nuevo biomarcador estructural para el tratamiento de AR temprana (7).

Aunque en el 2007 Danielle Diarra et al, identificaron el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) como un estimulador esencial de la proteína DKK-1, actuando como un inhibidor de la vía Wnt impidiendo de esta manera la remodelación ósea, y por ende produciendo daño articular (18).

En un estudio realizado en 2011 por Shi-Yao Wang et al, investigaron la función de la proteína Dickkopf-1 en la artritis reumatoide y determinaron el efecto del inhibidor (infliximab) sobre el factor de necrosis tumoral- α (FNT- α), encontrándose niveles séricos significativamente altos de DKK-1 en los pacientes con AR que en el grupo control y con otras enfermedades reumáticas. También se correlacionaron niveles

de PCR, VSG y progresión radiológica en los pacientes. En comparación con los pacientes que estaban siendo tratados con el inhibidor de FNT- α , se reflejó una importante disminución de la proteína DKK-1 en suero. En lo que concluyeron que el DKK-1 es un mediador significativo, ya que se correlaciona con la resorción ósea y la inflamación producida en pacientes con AR, indicando que el aumento de la proteína en suero puede sugerirse como biomarcador en la actividad de la enfermedad y que el inhibir del FNT- α puede disminuir la presencia de daño articular (19).

Como se ha descrito a lo largo del trabajo, uno de los factores desencadenantes de la AR es la correlación genética que esta tiene, por lo que un estudio realizado por Diederik PC de Rooy y colaboradores, determinaron que los pacientes con AR que presentan variantes genéticas de riesgo de DKK-1, poseen altos niveles séricos de la proteína DKK-1 en circulación, por lo tanto se va a evidenciar una destrucción progresiva de la articulación en el tiempo (20).

Por último los marcadores anteriormente mencionados indican el daño óseo y la severidad de la enfermedad durante el desarrollo de misma, por lo tanto su diagnóstico en etapas tempranas puede contrarrestar los efectos adversos sobre la salud y calidad de vida del paciente.

2. MARCO TEÓRICO

6.1 ARTRITIS REUMATOIDE

La AR es una enfermedad de naturaleza autoinmune, que está relacionada con discapacidad progresiva, complicaciones sistémicas, muerte temprana y consecuencias socioeconómicas de gran impacto en la calidad de vida del paciente (1). Afecta alrededor del 0.5 al 1.0% de la población del mundo (2, 3). La AR se caracteriza por una poliartritis crónica y la inflamación de la membrana sinovial e hiperplasia, por lo general de las articulaciones periféricas (manos, muñecas y pies), manifestaciones extra-articulares, dolor y rigidez lo cual puede conducir a la destrucción articular progresiva (cartílagos y huesos), dando como resultado deformidades, deterioro funcional y aumento de la morbilidad y mortalidad (21). Actualmente se desconoce la etiología de la enfermedad, pero la interacción de factores genéticos y ambientales podría coadyuvar al desarrollo de la misma, hay estudios que proponen el tabaquismo, como factor causal en el inicio y mantenimiento de la respuesta inflamatoria autoinmune que se da en la AR (10, 22). No obstante, se han identificado factores endocrinos, ambientales y genéticos involucrados en el desarrollo de la misma, los cuales son variables de una población a otra (23). Se ha sugerido una variedad de autoantígenos como inductores de la respuesta autoinmune en la AR (24, 25). Hasta hace poco, la determinación del factor reumatoideo (FR), una inmunoglobulina dirigida contra la fracción constante (Fc) de las inmunoglobulinas de clase IgG, era la única prueba utilizada para el estudio de esta patología. Sin embargo Los avances en la comprensión de su patogénesis han permitido asociar factores de riesgo genéticos como la como la presencia de HLA DRB1 denominado epítipo compartido y no genéticos como el tabaquismo y la presencia de autoanticuerpos circulantes como anticuerpos anti anti-CCP y los recientes anticuerpos anti-CarP con la aparición de la enfermedad y severidad de la misma (7, 13, 24, 25).

La *European League Against Rheumatism* (EULAR) en 2012 estableció los factores de riesgos en la AR para facilitar la investigación en las etapas preclínicas y las fases tempranas de esta, describiendo las recomendaciones y terminología que debe ser empleada para clasificar los subgrupos de pacientes en las diferentes fases de la enfermedad y especificar las prioridades de investigación en el área (26).

Así mismo se sugirieron las áreas más importantes para la investigación donde se incluyen otros tejidos en los que la respuesta inmune adaptativa pueda permitir la identificación de factores de riesgo y biomarcadores para el desarrollo y progresión de características extra-articulares de la AR. La cual involucra factores de riesgo externos que pueden actuar como desencadenantes de la enfermedad como el tabaquismo entre otros (2, 26) y la consideración de etapas tempranas para aquellos individuos quienes cumplan de menos de 2 años de evolución de la enfermedad con criterios de clasificación de la ACR/EULAR de 2010.

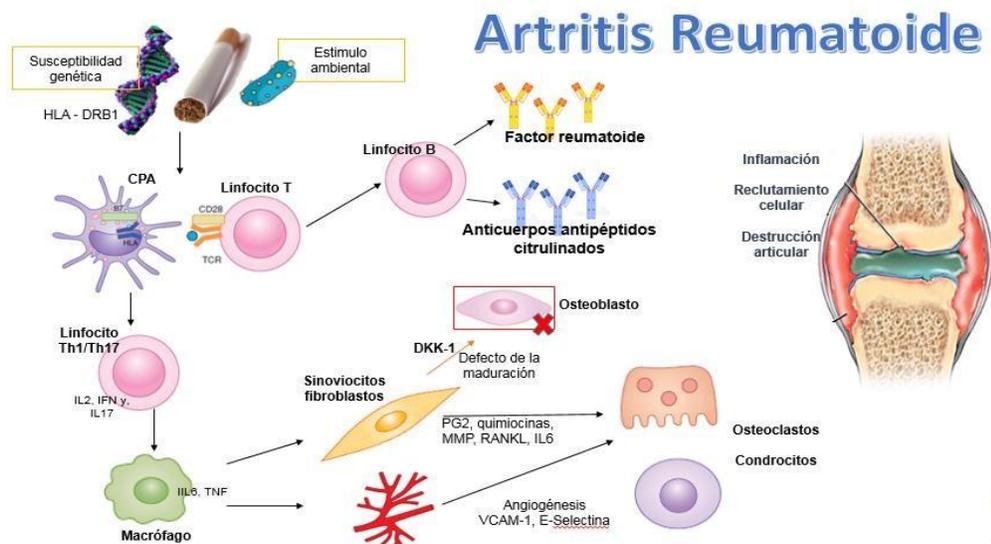


Imagen tomada de McInnes I. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med.* 2011;365:2205–19,

6.2 BIOMARCADORES ASOCIADOS A ENFERMEDAD

6.2.1 Factor Reumatoide (FR).

El FR hace parte de una familia de autoanticuerpos dirigidas primariamente contra sitios específicos de la región Fc de moléculas de IgG (27). Son producidos localmente en la AR por los linfocitos B presentes en estructuras como ganglios linfoides y folículos germinales que se forman en las cavidades sinoviales inflamadas en estos pacientes (28) El principal isotipo asociado en la AR es la IgM, con un porcentaje de detección del 60-80% de los pacientes (28, 29), por lo tanto es considerada como uno de los marcadores más importantes en el diagnóstico de la enfermedad y ha sido uno de los criterios de clasificación de la AR desde 1987 (30).

No obstante la presencia de FR se ha evidenciado en diferentes enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, la enfermedad mixta de tejido conectivo y el síndrome de Sjögren, de igual manera en condiciones donde no hay autoinmunidad, así como infecciones crónicas y a medida que la edad avanza (28).

Sin embargo, su limitada sensibilidad y especificidad ha hecho que se busquen otros marcadores serológicos más sensibles y específicos para el diagnóstico de la AR. De los autoanticuerpos estudiados se ha evidenciado la presencia de anticuerpos anti-proteínas citrulinadas los cuales han cobrado mayor relevancia debido a su aparición en estadios tempranos de la enfermedad y por la presencia de una mayor sensibilidad y especificidad frente al FR (28).

6.2.2 Anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (anti-CCP).

Los anticuerpos anti-CCP tienen una especificidad del 99-95% en la AR y se encuentran presentes alrededor del 70-90% de las personas que tienen la enfermedad (21). Los anticuerpos anti-CCP hacen parte de una familia de autoanticuerpos, siendo el isotipo IgG, el anticuerpo asociado con AR. En la actualidad se caracterizan por ser un marcador con más especificidad y está asociado con un alto valor predictivo de la enfermedad con respecto al FR. Estudios

previos han demostrado que los pacientes con anticuerpos anti-CCP desarrollan un curso más grave de la enfermedad con más destrucción radiológica (31, 32).

Este grupo de autoanticuerpos específicos de la AR está dirigido contra proteínas citrulinadas. Este proceso de citrulinación se da mediante una modificación postraducional del aminoácido arginina a citrulina por la enzima peptidil arginina deiminada (PAD), causando así la pérdida de la carga positiva del aminoácido a una carga neutra y provocando cambios estructurales los cuales modifican su peso molecular (4, 28). Este proceso se puede dar en condiciones naturales como la apoptosis, inflamación o queratinización (33). En los procesos inflamatorios, cuando ocurre muerte celular, en este caso los granulocitos apoptóticos crean un ambiente idóneo para la activación de la PAD debido al aumento del calcio que se da del exterior al interior de la célula. Por lo tanto, cuando estas células apoptóticas no se eliminan eficazmente en un entorno inflamatorio, las proteínas citrulinadas intracelulares se liberan en el espacio extracelular, donde son tomadas por células presentadoras de antígeno y la PAD que fue activada debido al aumento del calcio induce la citrulinación de proteínas sinoviales (28, 34).

Se han identificado seis isoformas de la PAD, entre los cuales las que tienen mayor relevancia frente a la AR son la los isotipos PAD2 y PAD4, lo que podría explicar daño articular en pacientes que presentan este tipo autoanticuerpos y por lo cual se ha asociado la citrulinación con esta enfermedad autoinmune (35). Entre las enzimas PAD identificadas tenemos (PAD1, PAD2, PAD3, PAD 4/5 y PAD6), estas se expresan en diferentes tejidos y cumplen una gran variedad de funciones las cuales son dependientes de calcio y estrógenos. La enzima PAD1 se expresa en el tejido epidérmico y uterino, involucrada en el proceso de queratinización. La enzima PAD2 se manifiesta en el tejido hematopoyético, en el nervioso central y el músculoesquelético. La enzima PAD-3 se encuentra en el folículo piloso. La enzima PAD4/5 se presenta en bazo, glándulas secretoras y granulocitos, finalmente la enzima PAD6 se expresa en tejidos como hígado y pulmones (34, 36, 37).

No obstante, se ha demostrado durante procesos inflamatorios otras proteínas sinoviales y no sinoviales como lo son el colágeno tipo II, la vimentina, proteínas nucleares y proteínas de estrés, donde los residuos de arginina de estas proteínas también pueden ser convertidas a citrulina mediante el proceso de citrulinación, por ende estas proteínas pueden ser reconocidas como antígenos y así desencadenar una respuesta por el sistema inmune (38, 39, 40).

6.2.3 Proteína C reactiva

La proteína C reactiva (PCR), hace parte de la familia de proteínas de pentatraxina (48). Es una proteína plasmática que se sintetiza en los hepatocitos, y es denominada de fase aguda debido a su capacidad para reaccionar con el polisacárido C aislado de las paredes de las células neumocócicas y su aumento en la concentración de los niveles plasmáticos al menos en un 25% durante procesos como infección, inflamación o muerte del tejido (49, 50)

La PCR se caracteriza por tener una alta afinidad por los residuos de fosfocolina presente en las células tanto procariotas como eucariotas (51), también tiene la capacidad de unirse a otra variedad de ligandos autólogos y extrínsecos (51, 52). Entre los ligandos autólogos puede unirse a lipoproteínas plasmáticas nativas y modificadas (52, 53), membranas celulares, histonas, fosfolípidos, células apoptóticas y en una pequeña proporción ribonucleoproteínas.

Entre los ligandos extrínsecos se pueden encontrar fosfolípidos, glucanos y componentes de microorganismos mediante la identificación de estructuras capsulares. Cuando la PCR se une a los ligandos mencionados anteriormente es reconocida por la C1q activando de forma eficaz la vía clásica del complemento (54), su capacidad para activar el complemento y opsonizar agentes extraños parecer tener un papel muy importante en la respuesta inmune innata frente a distintos patógenos, induciendo de esta manera la fagocitosis y destrucción de los microorganismos por parte de los macrófagos y neutrófilos (49, 55, 56).

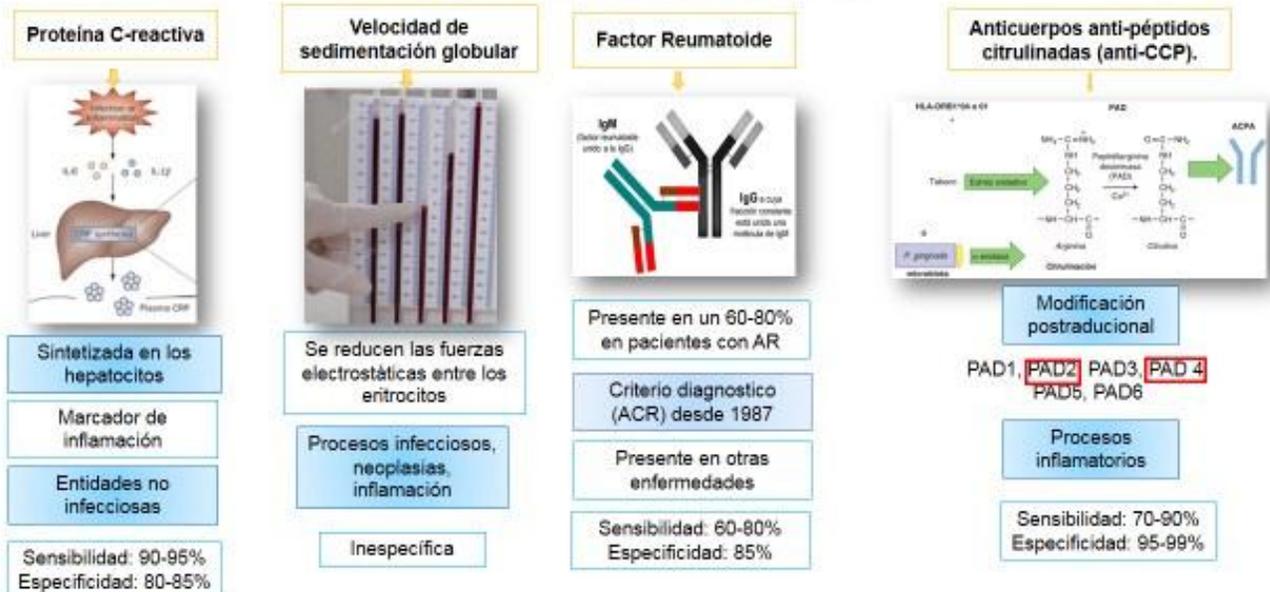
En la actualidad la PCR, es empleada como un marcador de inflamación en enfermedades como aterosclerosis (57), periodontitis (58) y artritis reumatoide (59, 60,). En la AR se emplea como un marcador potencial que indica un incremento en el riesgo en desarrollar AR, debido a que es un marcador sensible de inflamación local y sistémica y se encuentra aumentada en pacientes con dicha patología (59, 60, 61, 62).

En relación con la AR, cuando se encuentran niveles elevados de PCR se asocian con una rápida progresión y un daño articular severo, ya que, la PCR desempeña un papel muy importante en el proceso de inflamación que se da en la AR, es posible que la PCR esté asociada con el proceso destructivo óseo en la patogénesis de la AR. Un estudio realizado por Kyoung-Woon Kim y colaboradores, concluyeron que la PCR tiene la capacidad de inducir la expresión de RANKL, estimular la osteoclastogénesis y la función de resorción ósea de los precursores de osteoclastos. Por lo tanto, en pacientes con AR la importancia del tratamiento de pacientes con AR para reducir los niveles séricos de la PCR reside no sólo en el control de la actividad de la enfermedad, sino también en proporcionar la posibilidad de prevención de la destrucción ósea (61).

6.2.4. Velocidad de sedimentación globular

La VSG consiste en la sedimentación de los eritrocitos, provocado por un cambio en las cargas de la superficie de los eritrocitos, entre las proteínas que contribuyen en el aumento de la sedimentación son proteínas plasmáticas como el fibrinógeno en un 55%, esta prueba es usada con frecuencia en la práctica clínica por su bajo costo, fácil acceso y reproducibilidad, sin embargo también presenta desventajas, ya que este parámetro se ve en aumento con factores distintos a la AR, como son procesos infecciosos, inflamación, neoplasias, sexo y edad (60, 61).

Biomarcadores



Zeneng Wang et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nature Medicine* 13, 1176 - 1184 (2007)
 O. M. R. Westwood P. N. Nelson F. C. Hay. Rheumatoid factors: what's new? *Rheumatology*, Volume 45, Issue 4, 1 April 2006, Pages 379-385
 Kahleberg IM, Fox DA. Advances in the medical treatment of rheumatoid arthritis. *Vol. 27, Hand Clinics*. 2011. p. 11-20

6.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

6.3.1 EROSIONES OSEAS EN ARTRITIS REUMATOIDE

La erosión ósea es una característica central de la AR y está asociada con la gravedad de la enfermedad y un pobre resultado funcional, este desbalance entre osteoformación y reabsorción que lleva a la pérdida del hueso trabecular como del hueso cortical (63, 64, 65). La pérdida de la masa ósea se caracteriza por la presencia de pequeñas irregularidades en la superficie del hueso.

El esqueleto se compone de hueso trabecular una red ósea fina que aloja la médula ósea y el hueso cortical una capa densa que proporciona soporte estructural. Ambos tipos de hueso están destinados a la erosión en la AR (63). La erosión ósea articular representa la pérdida de hueso localizado (osteólisis), inicialmente en el hueso

cortical, y la destrucción de los espacios intertrabeculares. La osteólisis es el resultado de un desequilibrio en el cual la resorción ósea por osteoclastos es favorecida sobre la formación ósea por los osteoblastos (64, 65, 66).

Los osteoclastos, células multinucleadas gigantes derivadas del linaje monocítico, son las únicas células capaces de reabsorber el hueso en el cuerpo. Los osteoclastos están diseñados para reabsorber el hueso adheriéndose firmemente a la superficie ósea a través de interacciones con integrinas y proteínas de matriz extracelular (65, 66).

El desarrollo de osteoclastos ocurre localmente en el tejido sinovial como resultado de la expresión de los dos mediadores osteoclastogénicos esenciales, el Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) (67) y el activador del receptor del ligando del factor nuclear κ B (RANKL) (68, 69). Este proceso implica la migración de células precursoras de osteoclastos desde la médula ósea hacia los órganos linfáticos secundarios y finalmente a las articulaciones. Una vez dentro del microambiente de la articulación, estas células están expuestas a mediadores solubles y se diferencian hacia osteoclastos. La diferenciación final en osteoclastos que resorben los huesos se consigue después del contacto con la superficie ósea (63).

Adicionalmente la presencia de anticuerpos anti-CCP y anticuerpo anti-CarP en el suero de pacientes con AR, han revelado estar relacionada con la erosión ósea articular en estos pacientes (25, 70, 71, 72). La unión de anti-CCP a la superficie celular aumenta la diferenciación a osteoclastos mediante la producción de TNF. Adicionalmente los osteoclastos expresan altos niveles de la enzima peptidilarginina deiminasa tipo 2 (PADI2), que es inducida por el flujo de calcio y es responsable de la citrulinación de las proteínas (Figura 1) (35, 73, 74). En células de linaje osteoclastos, la activación de PADI2 conduce a la citrulinación de vimentina haciéndola accesible para la generación de anti-CCP, induciendo además aumento de osteoclastos y así de resorción ósea, soportando la interacción entre la inflamación y daño óseo en la AR (Figura 2) (74).

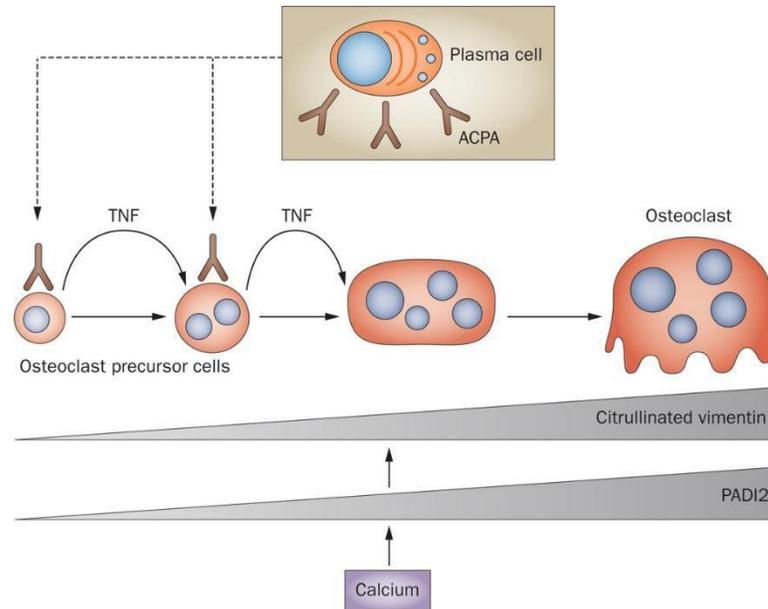


Figura 1 Autoanticuerpos y osteoclastogénesis. Figura tomada de Schett G and Gravallesse E. Nat Rev Rheumatol 2012; 8(11): 656–664

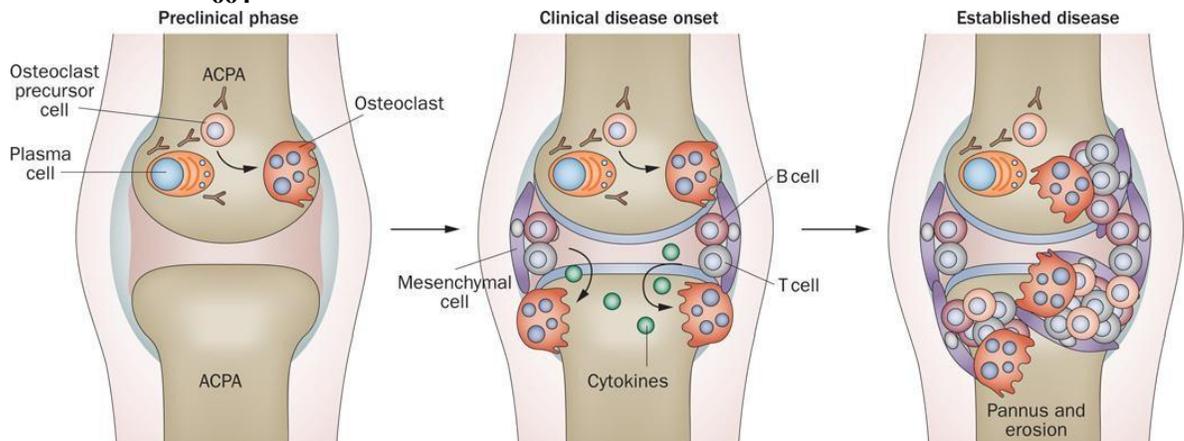


Figura 2 Interacción entre la inflamación y daño óseo Figura tomada de Schett G and Gravallesse E. Nat Rev Rheumatol 2012; 8(11): 656–664

Estas erosiones se pueden evidenciar en la interfase entre el pannus y el tejido óseo adyacente la cual se relaciona con una mayor severidad de la enfermedad aumentando su grado de discapacidad y morbi-mortalidad en los individuos (63, 75). Estas se observan mediante radiografías, donde se evidencia una disminución de la densidad ósea en la superficie del hueso especialmente en las márgenes de las articulaciones. Igualmente, estudios realizados anteriormente han demostrado la

presencia de erosiones óseas en etapas tempranas de la enfermedad (76). Convirtiéndolo en el principal predictor de daño osteoarticular en AR por la presencia de pérdida ósea al inicio de la enfermedad (77).

Existen otros mecanismos patogénicos relacionados al desarrollo de la erosión ósea, como la afectación de los reguladores de la formación ósea como las proteínas sintetizadas por el grupo de los genes (Wnt) que son mediadores clave de la osteoblastogénesis y gobiernan la formación del hueso durante el desarrollo embrionario (78). Varios miembros de la familia de proteínas Wnt se unen a un complejo de receptores (que consiste en LPR5 / 6 y receptores frizzled) en la membrana plasmática de las células mesenquimales, lo que implica la diferenciación osteoblástica (79, 80). La señalización Wnt es modulada por varias familias diferentes de reguladores negativos secretados. Como la expresión de la proteína Dickkopf 1 (DKK-1) por los fibroblastos sinoviales que inhibe la actividad de los osteoblastos que resulta en el aumento de la resorción ósea y la disminución de la formación ósea, dando lugar a la erosión (8, 17, 81). Niveles altos de marcadores como el DKK1 en suero se han reportado en patologías relacionadas con reabsorción ósea como AR y periodontitis y niveles bajos en patologías como espondilitis anquilosante (8, 17, 82).

6.4 VÍA Wnt

La definición de la vía Wnt (Wingless) se definió inicialmente por la homología de secuencia que presentaban los miembros originales Wnt-1 en el ratón (primero llamado *int -1*, Nusse y Varmus (83, 84) y posteriormente en la *Drosophila* fue descrita como *sin alas* (*wg*) por Cabrera et al (85).

Por lo tanto, se describe que la vía Wnt es una vía de señalización celular muy conservada a lo largo de la escala filogenética. Interviene en procesos como la embriogénesis, la organogénesis, la tumorigénesis y en la regulación ósea (86, 87).

Las moléculas Wnt son una familia de ligando de glicoproteína las cuales muestran un patrón conservado de 23-24 residuos de cisteína (88). Estos ligandos de glicoproteínas se unen a receptores de superficie celular de la familia Frizzled (Fz), activando una serie de vías de señalización intracelular mediante su unión, cuyo desenlace es la diferenciación celular y el crecimiento. La cascada de señalización procedente de la interacción entre Wnt-Fz, se ve reflejada por distintos reguladores extracelulares, citoplasmáticos y nucleares. Las diversas señales intracelulares inducidas por la vía Wnt se ve reflejada en la activación de la vía canónica o clásica y la vía no canónica (89).

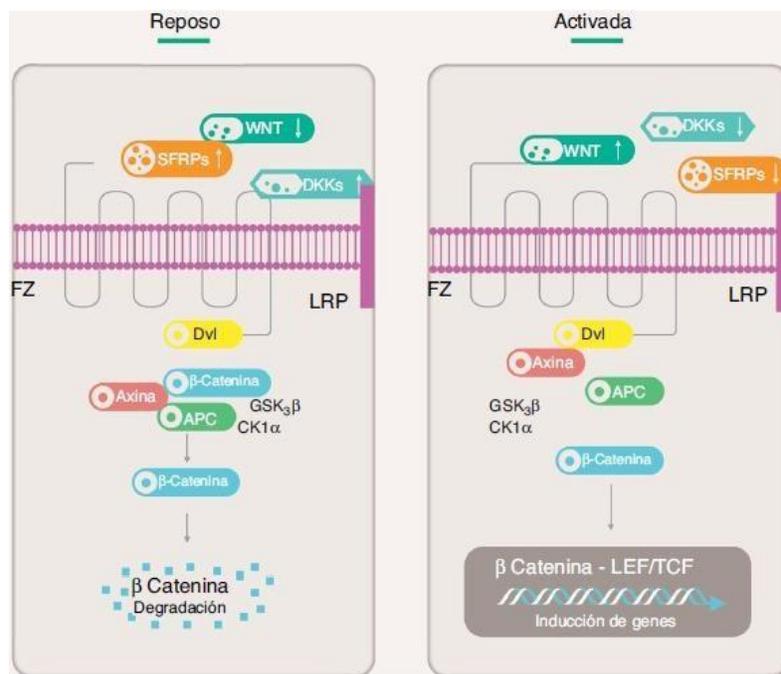


Figura 3 Vía canónica de señalización Wnt. Figura tomada Rodrigo Giraldo B, Ana María Santos y John Londoño. REV COLOMB R EUMATOL. 2015;22(2):119–125

6.4.1 LA VÍA CANÓNICA

Las moléculas Wnt luego de ser secretadas por células se unen al receptor de membrana Fz, el cual forma un complejo con la proteína receptora de LDL (LRP) ubicado en la superficie de la célula. Esta interacción favorece una cascada de señalización la cual implica distintas proteínas intracelulares, como: Disheveled (Dvl), glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3β), axina, β-catenina, poliposis

adenomatosa coli (APC) y caseína quinasa 1 (CK1). En las células en reposo, la β catenina es fosforilado por la GSK30 mientras esta conforma un complejo multiproteico con APC, axina y CK1 y es marcada para proteólisis dependiente de ubiquitinación. En estado activo, tras la unión Wnt con el complejo Fz/LRP se inicia la activación de la proteína Dvl, que en su estado activo se da la disociación del complejo multiproteico inactivando la GSK3 β , favoreciendo la acumulación de β catenina en el citoplasma. El exceso de β -catenina libre en el citoplásmica libre es traslocada al núcleo donde interactúa con los factores de transcripción, que son el factor promotor linfático (LEF) y el factor de células T (TCF), causando la activación transcripcional de los genes diana (89, 90, 91)

Sin embargo, se han descrito moléculas que son capaces de regular la vía Wnt. Existen proteína solubles de tipo frizzled que son segregadas al medio extracelular y las cuales se fijan a los ligandos Wnt y de esta manera compiten por la unión al receptor. Otro mecanismo que tienen la capacidad inhibir la señales de la Wnt ya que se unen a los co-receptores LRP5/6 y proteínas Kremen, son las proteínas de la familia Dickkopf (DKK), estudios describen que por lo menos cuatro miembro de esta familia, en especial la tipo 1 (DKK-1) cumple un papel importante en el eje osteoblatico-osteoclastico. La esclerostina, codificada por el gen OST que se expresa en los osteocitos, parece fijarse a LRP5/6, impidiendo la formación del complejo LRP5/6-frizzled-Wnt (92, 93).

6.4.2 VÍA NO CANÓNICA

La vía no canónica conduce la cascada de señalización independiente de β catenina, a diferencia de la vía canónica. Esta vía es dependiente de calcio (Wnt/Ca²⁺), por lo tanto, se describen proteínas como la Wnt5 que inicia la cascada de señalización obteniendo como resultado la liberación de calcio intracelular y la siguiente activación de la proteína calmodulina quinasa II (CamKII) y la proteína quinasa C (PKC) en ausencia de β -catenina. También sugieren que la señalización mediada por Wnt5 promueve la activación del factor de transcripción NF κ B, lo cual podría mediar la activación transcripcional de genes que codifican para citocinas y quimiocinas proinflamatorias (89, 90, 91).

6.5 PROTEÍNA DICKKOPF-1 (DKK-1)

La Dickkopf-1 hace parte de una familia de glicoproteínas, las cuales se componen de 259 aminoácidos y dos dominios conservados ricos en cisteína (CDR) (89, 90) quienes median las interacciones proteína-proteína, cada dominio posee 10 residuos de cisteína. El dominio amino terminal rico en cisteína (Cys-1) es único para cada DKK, mientras que el dominio carboxi-terminal rico en cisteína (Cys-2) es conservado entre todos los miembros de la familia DKK (95).

Se han descrito al menos cuatro formas (DKK-1, DKK-2, DKK-3, DKK-4) (94). Sin embargo, el que más se ha estudiado es el DKK-1 que funciona como un antagonista natural de la vía de señalización Wnt. DKK-1 se une al co-receptor de superficie celular LRP5/6 y proteínas Kremen, esta unión promueve la internalización del complejo receptor y amortigua la señal Wnt de la vía canónica Wnt (90, 94).

Dkk-1 inhibe con alta especificidad la cascada de señalización Wnt- β catenina, mediante la unión en la región C-terminal 3 y 4 de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP) 5/6, así como al receptor transmembrana Kremen, dando como resultado la conformación del complejo proteico DKK-LRP/Krm en la membrana celular, este posteriormente se desplaza al citoplasma dándose de esta manera la pérdida de receptores LRP5/6 de membrana (92, 95, 96).

No obstante, se ha demostrado que el DKK-1 es un regulador importante de la masa ósea, este parece participar de manera activa en la remodelación y daño osteoarticular en pacientes con AR (17).

6.6 RELACIÓN ENTRE NIVELES DE DKK1 Y DESENLACES EN AR

Después de lo expuesto anteriormente, se puede evidenciar que la progresión de la AR está condicionada con factores genéticos y ambientales que pueden desencadenar la enfermedad o aumentar su severidad, por lo tanto se ha evaluado otros mecanismos fisiopatológicos que conllevan al desarrollo de la erosión ósea. Actualmente el mejor predictor de la AR temprana se hace mediante evaluaciones radiográficas de la presencia de erosión ósea, sin embargo el uso de biomarcadores predictivos que expresen la progresión estructural de la enfermedad son muy restringidos en la práctica clínica (8).

En hallazgos recientes se han encontrado mecanismos patogénicos relacionados con la pérdida ósea, como es el caso de la proteína DKK-1, debido a que se han encontrado niveles elevados en suero de este marcador en patologías asociadas con resorción ósea como la AR (8).

La revisión realizada por Daoussi y Andonopoulos en 2011, sobre el rol emergente de Dickkopf-1 en la biología ósea: como el factor principal que controla la remodelación ósea y articular, se evidencio un aumento en los niveles de DKK-1 en relación con disminución de la densidad ósea, igualmente se ha relacionado con procesos de remodelación del hueso en la AR y la espondilitis anquilosante. Debido a que cumple un papel importante en la regulación de la masa ósea y la remodelación articular este podría convertirse en un blanco terapéutico de la enfermedad (17).

Un estudio realizado por Raphaèle Seror y colegas en 2016, determinan los niveles séricos de la proteína DKK-1 y SOST en pacientes con AR temprana, donde los autores concluyen que la presencia de la proteína DKK-1 se encuentra aumentada en pacientes con AR con 2 años de evolución de la enfermedad sin progresión radiológica, sugiriendo que la proteína DKK-1 podría ser un nuevo biomarcador estructural para el tratamiento de AR temprana (8).

Aunque en el 2007 Danielle Diarra et al, identificaron el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) como un estimulador esencial de la proteína DKK-1, actuando como un

inhibidor de la vía Wnt impidiendo de esta manera la remodelación ósea, y por ende produciendo daño articular (94).

En un estudio realizado en 2011 por Shi-Yao Wang et al, investigaron la función de la proteína Dickkopf-1 en la artritis reumatoide y determinaron el efecto del inhibidor (infiximab) sobre el factor de necrosis tumoral- α (FNT- α), encontrándose niveles séricos significativamente altos de DKK-1 en los pacientes con AR que en el grupo control y con otras enfermedades reumáticas. También se correlacionaron niveles de PCR, VSG y progresión radiológica en los pacientes. En comparación con los pacientes que estaban siendo tratados con el inhibidor de FNT- α , se reflejó una importante disminución de la proteína DKK-1 en suero. En lo que concluyeron que el DKK-1 es un mediador significativo, ya que se correlaciona con la resorción ósea y la inflamación producida en pacientes con AR, indicando que el aumento de la proteína en suero puede sugerirse como biomarcador en la actividad de la enfermedad y que el inhibir del FNT- α puede disminuir la presencia de daño articular (19).

Como se ha descrito a lo largo del trabajo, uno de los factores desencadenantes de la AR es la correlación genética que esta tiene, por lo que un estudio realizado por Diederik PC de Rooy y colaboradores, determinaron que los pacientes con AR que presentan variantes genéticas de riesgo de DKK-1, poseen altos niveles séricos de la proteína DKK-1 en circulación, por lo tanto se va a evidenciar una destrucción progresiva de la articulación en el tiempo (20).

Por último los marcadores anteriormente mencionados indican el daño óseo y la severidad de la enfermedad durante el desarrollo de misma, por lo tanto su diagnóstico en etapas tempranas puede contrarrestar los efectos adversos sobre la salud y calidad de vida del paciente.

3. METODOLOGÍA

7.1 . TIPO DE INVESTIGACIÓN

Estudio de corte transversal.

7.2 POBLACIÓN

Pacientes con AR temprana de menos de 2 años de evolución que estén actualmente participando en las convocatorias internas del Hospital Militar Central Asociación de marcadores óseos y anticuerpos anti carbamilados y su relación con índices periodontales y de actividad reumatológica en pacientes con AR temprana y en familiares en primer grado de pacientes con AR 2015-47 y de la Universidad El Bosque, titulado DKK1 como marcador de progresión de enfermedad periodontal en pacientes con Artritis Reumatoide Temprana 2016-8806 y que cumplan con las condiciones establecidas, tanto para los criterios en AR temprana como los que puedan interferir con el desarrollo normal de las pruebas.

7.3 MUESTRA

Se tomaron la totalidad de pacientes que aceptaron participar en el estudio. Los pacientes ingresaron al estudio de acuerdo a los criterios de selección durante el período de estudio, entre los meses mayo 2015- agosto 2017

7.4 SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Recolección no probabilística por conveniencia.

7.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Pacientes mayores de 18 y menores de 65 años con criterios clasificatorios de AR según el consenso de ACR y EULAR de 2010 (18), con evolución menor a 2 años.

7.6 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Individuos con proceso infeccioso en curso o diagnóstico de neoplasia.
- Individuos con diagnóstico de diabetes mellitus.
- Pacientes que rehúsen entrar al estudio y por tanto no firmen el consentimiento informado.
- Pacientes con dificultades para completar la información pertinente
- Pacientes que se encuentren bajo tratamiento antibiótico antes de tres meses previos a la toma de las muestras.
- Pacientes con aparatología ortodóntica.
- Pacientes que hayan tenido terapia periodontal en los últimos 6 meses.
- Pacientes en embarazo o lactancia.
- Tener más de dos años de diagnóstico de AR.

7.7 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

7.7.1 Detección y cuantificación de anticuerpos anti-CCP

Para la medición cuantitativa de IgG/IgA contra péptido citrulinado en suero, se empleó un sistema ELISA tipo sándwich (Quanta lite® CCP 3.1 IgG/IgA, INNOVA Diagnosis, San Diego, CA, USA y IMTEC –ITC 60015).

7.7.2 Medición de Factor Reumatoide

Se medirá por técnica de nefelometría cinética, en donde se detecta la parte de la luz que es dispersada en una variedad de ángulos. Al suero del paciente se le agregará un anticuerpo dirigido contra el factor reumatoide el cual en caso positivo formará un agregado sobre el cual un láser detectará y generará dispersión de la luz, la cual será cuantificada e informada en UI/mL (Beckam Coulter 447070, Immage 800®).

7.7.3 Medición de PCR ultrasensible (Immulate 1000, Siemens®):

Se realizarán por quimioluminiscencia, esta es definida como la emisión de luz asociada con la disipación de la energía con una sustancia electrónicamente excitada. Si los electrones de un componente luminiscente son estimulados por una luz en estado normal, estos dan energía en forma de luz cuando ellos regresan al estado basal. El resultado final será en mg/L y en UI/mL respectivamente.

7.7.4 Medición de la velocidad Globular

La determinación de la VSG se realizará por método automatizado de fotometría capilar cuantitativa en mm/hora. En ésta técnica se mide la velocidad de sedimentación de los glóbulos rojos, utilizando sangre anticoagulada que se introduce en una columna, indica cuantos milímetros cúbicos se sedimentaron o asentaron los glóbulos rojos durante una hora.

7.7.5 Detección y cuantificación de la proteína DKK-1

Se hizo por medio de un kit cuantitativo de ELISA en sándwich, para la determinación de DKK-1 en suero, siguiendo los protocolos establecidos. La placa de microtitulación está recubierta con un anticuerpo purificado específico de la proteína DKK-1, luego se agregó la muestra y el anticuerpo DKK-1 marcado con biotina, posteriormente se añadió un conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) a cada pocillo de la placa y se incubó, en seguida se lava completamente y se agrega una solución de sustrato TMB, el cual produce un cambio de color de amarillo a azul,

debido a la enzima-HRP, la reacción se determina mediante la adición de una solución de ácido sulfúrico y el cambio de color es medido espectométricamente con longitud de onda de 450nm. La concentración de la proteína relacionada DKK1 en las muestras se determina mediante la comparación de las densidades ópticas DO de las muestras con la curva estándar.

La participación de la estudiante de expreso propiamente en la realización de las pruebas de ELISA para la búsqueda de la proteína DKK-1, los demás análisis fueron datos obtenidos y asignados en la base de datos de los pacientes pertenecientes a estudios desarrollados anteriormente por el Hospital militar central.

7.7.6 Evaluación de la actividad reumática

Este procedimiento en los pacientes se realizará siguiendo el protocolo de valoración establecido en el *Disease Activity Score 28 – DAS28* (93). Este índice valora el grado de actividad de la enfermedad en la AR, mediante el recuento de 28 articulaciones dolorosas (NAD28), tumefactas (NAT28), VSG y evaluación global de la salud efectuada por el paciente, sobre la puntuación convertidas a valores 1 a 100 del VAS (Pain Visual Analogue Scale). El cálculo se realiza con la siguiente fórmula: $DAS28 = 0.56 (\sqrt{NAD28}) + 0.28 (\sqrt{NAT28}) + 0.70 (\ln VSG) + 0.014 (EGP)$. La evaluación de la actividad reumática fue llevada a cabo por profesionales en reumatología y residentes de la especialidad de reumatología que se encontraban trabajando en el área de inmunología especial del Hospital Militar Central.

7.8 ASPECTOS ÉTICOS

El proyecto describe una investigación científica en sujetos humanos con un riesgo mínimo que está sujeto a todo lo dispuesto en la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia. Esta investigación tendrá en cuenta los artículos a los que hace alusión dicha resolución en el capítulo I de los aspectos éticos de la investigación en humanos y por las características del estudio que lo clasifica como

riesgo mínimo, todo participante firmará un consentimiento informado antes de iniciar el estudio. Adicionalmente, las muestras de sangre serán tomadas por personal totalmente entrenado y el total de sangre a extraer está dentro del rango que determina este capítulo para su clasificación como riesgo mínimo.

En el marco de la ley 23 de 1981, ley de ética médica, este trabajo se rige bajo los preceptos de respeto a los pacientes sujetos del estudio, protegiendo su integridad y la confidencialidad de los datos que sean extraídos de sus historias clínicas, así como se respetaran los derechos de propiedad intelectual de sus autores, y según lo estipulado en la norma este trabajo se ceñirá estrictamente a hechos científicos comprobados actuales.

Bajo lo reglamentado en la resolución 008430 de 1993, que regula en Colombia lo relacionado a la investigación científica, este estudio fue aprobado por el comité de ética médica del Hospital Militar Central según lo establece la norma. Adicionalmente se cumplió con respetar la dignidad de los pacientes sujetos del estudio, protegiendo sus derechos y bienestar. La aprobación por el comité de ética quedo incluida en el acta No 21 del 04 de Diciembre de 2015- proyecto HMC 2015047 (Anexos)

4. RESULTADOS

Se aceptaron 60 individuos con diagnóstico de artritis reumatoide temprana por criterio ACR. El grupo estuvo distribuido entre 50(79,4%) mujeres y 13(20,6%) hombres. Se identificaron 31(49,2%) de los pacientes con presencia de comorbilidades, y 24 (38,1) pacientes con un IMC de 25 a 30. Del número total de individuos 11(17,5%) de ellos han tenido contacto con el humo del cigarrillo, de los cuales 4(6,3%) fuman actualmente y 22(34,96%) tuvieron exposición al cigarrillo **(Tabla 1).**

Tabla 1. Características sociodemográficas del grupo total de pacientes ARt

	ARt n:63 (100%)
Sexo	
Hombre	13 (20,6)
Mujer	50 (79,4)
Comorbilidad	
No	32 (50,8)
Si	31 (49,2)
Fuma	
No	59 (93,7)
Si	4 (6,3)
Fumó	
No	41 (65,1)
Si	22 (34,9)
Fumador pasivo	
No	52 (82,5)
Si	11 (17,5)
Economía	
Hogar	
Independiente	21 (33,3)
Empleado	7 (11,1)
Pensionado	26 (41,3)
Estudiante Vivienda	7 (11,1)
	2 (3,2)
Propia	46 (73,0)
Arrendada	14 (22,2)
Común	3 (4,8)
Estado Civil	
Casado	37 (58,7)
Soltero	14 (22,2)
Viudo	2 (3,2)
Unión libre Separado	7 (11,1)
	3 (4,8)
Nivel de estudios	
Primaria	9 (14,3)
Bachillerato	17 (27,0)
Técnico	9 (14,3)
Universitario	28 (44,4)
Índice de masa corporal	
> 25	30 (47,6)
De 25 a 30	24 (38,1)
> 30	9 (14,3)

Del número total de pacientes pertenecientes al estudio 48 (76,2) manifestaron tener más de 1 articulación dolorosa y 46 (73,0) presentan al menos 1 articulación

inflamada. La valoración de la actividad articular se llevó a cabo mediante la medición de los índices de actividad reumática DAS28 y SDAI, el promedio del DAS28 VSG fue de $3,74 \pm 1.579$. El promedio para el DAS28 PCR fue de $3,479 \pm 1.080$. En cuanto al SDAI su valor promedio fue de $13,33 \pm 11,00$, un 38(60,3) tenían un valor mayor a 11.

Respecto a los marcadores serológicos evaluados en este estudio, el promedio de DKK-1 fue de $372,07 \pm 2131,05$, el valor de la VSG fue $23,27 \pm 26,71$ mm/h. El resultado de la PCR fue de $16,57 \pm 31,34$ mg/l. El promedio del FR fue de $57,40 \pm 61,10$ UI/ml y el valor promedio del Anti-CCP IgG/IgA fue de $110,77 \pm 159,05$ (Tabla 2).

Tabla 21. Parámetros reumatológicos del grupo total de pacientes con ARt

	ARt n=63 (100%)
Articulaciones dolorosas	
Mayor a 1	48 (76,2)
Articulaciones Inflamadas	
Mayor a 1	46 (73,0)
DAS 28 VSG	
Media \pm DE	$3,74 \pm 1.579$
DAS 28 PCR	
Media \pm DE	$3,479 \pm 1.080$
SDAI	
Media \pm DE	$13,33 \pm 11,00$
≤ 3.3	10 (15,4)
3.3-11	15 (23,8)
>11	38(60,3)
DKK-1	$372,07 \pm 2131,05$
Media \pm DE	
VSG	$23,27 \pm 26,71$
Media \pm DE	
PCR	$16,57 \pm 31,34$
Media \pm DE	
FR	$57,40 \pm 61,10$
Media \pm DE	
Anti-CCP IgG/IgA	$110,77 \pm 159,05$
Media \pm DE	

Para el análisis se establecieron rangos basados en el percentil 33 a partir de los resultados de DKK-1 en suero, se determinaron tres niveles de medición, el nivel bajo de 0.058 y 22.5 pg/ml, nivel medio con 22.6 – 101.59 pg /ml y niveles altos para concentraciones superiores a 101.6 pg/ml. Además, se realizaron subcategorías: 1) leve/ moderado (De 0.058 a 101.58 pg/mL) y 2) moderado/alto (superiores a 22.51 pg/mL).

En el grupo total estuvo distribuido 50 (79,4%) de mujeres y 13(20,6%) hombres; distribuido en 93,3% mujeres y 6,7% hombres con niveles séricos leves de DKK-1, 80,0% mujeres y 20,0% hombres con niveles moderados y 69,6% mujeres y 30,4% hombres con niveles altos. Conjuntamente se observó que los pacientes con niveles moderados de DKK-1 en suero presentaron una mayor frecuencia de comorbilidades y que los individuos que tenían niveles altos de DKK-1 en suero eran fumadores pasivos en 43,5%, sin observarse diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 3**).

Tabla 3 Comparación de niveles séricos de DKK-1 con las características sociodemográficas del Artritis Temprana

	Leve n=63 (100%)	Moderado n=63 (100%)	Alto n=63 (100%)	Valor p
Sexo				
Hombre	1 (6,7)	5 (20,0)	7 (30,4)	0,208
Mujer	14 (93,3)	20 (80,0)	16 (69,6)	
Comorbilidad				
No	6 (40,0)	13 (52,0)	13 (56,5)	0,602
Si	9 (60,0)	12 (48,0)	10 (43,5)	
Fuma				
No	13 (86,7)	23 (92,0)	23 (100,0)	0,234
Si	2 (13,3)	2 (8,0)	0 (0,0)	
Fumó				
No	12 (80,0)	16 (64,0)	13 (56,5)	0,329
Si	3 (20,0)	9 (36,0)	10 (43,5)	

Fumador pasivo				
No	11 (73,3)	20 (80,0)	21 (91,3)	
Si	4 (26,7)	5 (20,0)	2 (8,7)	0,330
Economía				
Hogar	9 (60,0)	8 (32,0)	4 (17,4)	
Independiente	2 (13,3)	2 (8,0)	3 (13,0)	
Empleado	2 (13,3)	10 (40,0)	14 (60,9)	
Pensionado	1 (6,7)	4 (16,0)	2 (8,7)	
Estudiante	1 (6,7)	1(4,0)	0 (0,0)	0,126
Vivienda				
Propia	12 (80,0)	18(72,0)	16 (69,6)	
Arrendada	2 (13,3)	6 (24,0)	6 (26,1)	
Común	1 (6,7)	1 (4,0)	1 (4,3)	0,907
Estado civil				
Casado	11 (73,3)	11 (44,0)	15 (65,2)	
Soltero Viudo	2 (13,3)	8 (32,0)	4 (17,4)	
Unión libre	0 (0,0)	1 (4,0)	1 (4,3)	
Separado	2 (13,3)	3 (12,0)	2 (8,7)	
	0 (0,0)	2 (8,0)	1 (4,3)	0,693
Estudios				
Primaria	1 (6,7)	3 (12,0)	5 (21,7)	
Bachillerato	7 (46,7)	6 (24,0)	4 (17,4)	
Técnico	2 (13,3)	2 (8,0)	5 (21,7)	0,376
Universitario	5 (33,3)	13 (52,0)	9 (39,1)	
Otros	0 (0,0%)	1 (4,0)	0 (0,0)	

Las características por subcategorías leve vs moderado/alto revelaron que pacientes con niveles de DKK-1 moderados/altos fuman actualmente en un 95,7% y presentan comorbilidades en un 53,2% (**Tabla 4**), por otro lado, en la subcategoría leve/moderado presentaban en un 48,8% comorbilidades y consumo de cigarrillo actual en un 90,2% (**Tabla 5**).

Tabla 4 Comparación los niveles leve y moderado/alto de DKK-1 en suero con las características sociodemográficas de pacientes con Art

	Leve n=63 (100%)	Moderado/Alto n=63 (100%)	Valor p
Sexo			
Hombre	1 (6,3)	12 (25,5)	
Mujer	15 (93,8)	35 (74,5)	0,100

Comorbilidad			
No			
Si	7 (43,8)	25 (53,2)	
	9 (56,3)	22 (46,8)	0,514
Fuma			
No			
Si	14 (87,5)	45 (95,7)	
	2 (12,5)	2 (4,3)	0,243
Fumó			
No			
Si	13 (81,3)	28 (59,6)	
	3 (18,8)	19 (40,4)	0,116
Fumador pasivo			
No			
Si	12 (75,0)	40 (85,1)	
	4 (25,0)	7 (14,9)	0,358
Economía			
Hogar	9 (56,3)	12 (25,5)	
Independiente	2 (12,5)	5 (10,6)	
Empleado	3 (18,8)	23 (48,9)	
Pensionado	1 (6,3)	6 (12,8)	
Estudiante	1 (6,3)	1 (2,1)	0,128
Vivienda Propia			
Arrendada	12 (75,0)	34 (72,3)	
Común	2 (12,5)	12 (25,5)	
	2 (12,5)	1 (2,1)	0,164
			0,562
Estado civil			
Casado	11 (68,8)	26 (55,3)	
Soltero	2 (12,5)	12 (25,5)	
Viudo	1 (6,3)	1 (2,1)	
Unión libre	2 (12,5)	5 (10,6)	
Separado	0 (0,0)	3 (6,4)	
<hr/>			
Estudios			0,443
Primaria	1 (6,3)	8 (17,0)	
Bachillerato	7 (43,8)	10 (21,3)	
Técnico	2 (12,5)	7 (14,9)	
Universitario	6 (37,5)	21 (44,7)	
Otros	0 (0,0)	1 (2,1)	

Tabla 5 Asociación de los niveles leve y moderado/alto de DKK-1 en suero con las características sociodemográficas de pacientes con Art

	Leve - Moderado n=63 (100%)	Alto n=63 (100%)	Valor p
Sexo			
Hombre	6 (14,6)	7 (31,8)	0,108
Mujer	35 (85,4)	15 (68,2)	

Comorbilidad			
No	20 (48,8)	12 (54,5)	0,663
Si	21 (51,2)	10 (45,5)	
Fuma			
No	37 (90,2)	22 (10,0)	0,130
Si	4 (9,8)	0 (0,0)	
Fumó			
No	29 (70,7)	12 (54,5)	0,199
Si	12 (29,3)	10 (45,5)	
Fumador pasivo			
No	32 (78,0)	20 (90,9)	0,200
Si	9 (22,0)	2 (9,1)	
Economía			
Hogar Independiente	17 (41,5) 4 (9,8)	4 (18,2) 3 (13,6)	0,176
Empleado	13 (31,7)	13 (59,19)	
Pensionado	5 (12,2)	2 (9,1)	
Estudiante	2 (4,9)	0 (0,0)	
Vivienda			
Propia	30 (73,2)	16 (72,7)	0,368
Arrendada	8 (19,5)	6 (27,3)	
Común	3 (7,3)	0 (0,0)	
Estado civil			
Casado	22 (53,7)	15 (68,2)	0,743
Soltero	10 (24,4)	4 (18,2)	
Viudo	2 (4,9)	0 (0,0)	
Unión libre	5 (12,2)	2 (9,1)	
Separado	2 (4,9)	1 (4,5)	
Estudios			
Primaria			0,266
Bachillerato	4 (9,8)	5 (22,7)	
Técnico	13 (31,7) 4 (9,8)	4 (18,2) 5 (22,7)	
Universitario			
Otros	19 (46,3) 1 (2,4)	8 (36,4) 0 (0,0)	

La evaluación radiológica se llevó a cabo por la medición del score de SENS (*Del inglés, Narrowing Simple Erosion Score*) identificando 6 (40,0%) pacientes con niveles leves de DKK-1 en suero que presentaban SENS mayor a 2 y para SENS mayor a 1 se encontraron 4 (26,7%) con niveles leves de DKK-1. Respecto a los marcadores serológicos los pacientes con el 33,3% presentaban niveles mayores a 20 de VSG, el 60,0%, el 53,3% FR a mayor a 20 y 40,0% de Anti CCP mayor a 20; aquellos con niveles moderados de DKK-1 en suero el 28,0% tuvieron valores mayores a 20 de VSG, 68,0% la PCR mayor a 3, 64,0% FR mayor a 20 y 36,0% de Anti CCP mayor a 20 y por ultimo aquellos con niveles altos de DKK-1 el 43,5% tenían niveles mayores a 20 de VSG, el 47,8% tenían la PCR mayor a 3, el 73,9%

FR a mayor a 20 y 47,8% Anti CCP mayor a 20, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 6**).

Tabla 6. Comparación de los niveles leve, moderado y alto de DKK-1 en suero con las variables reumatológicas en el grupo con ARt

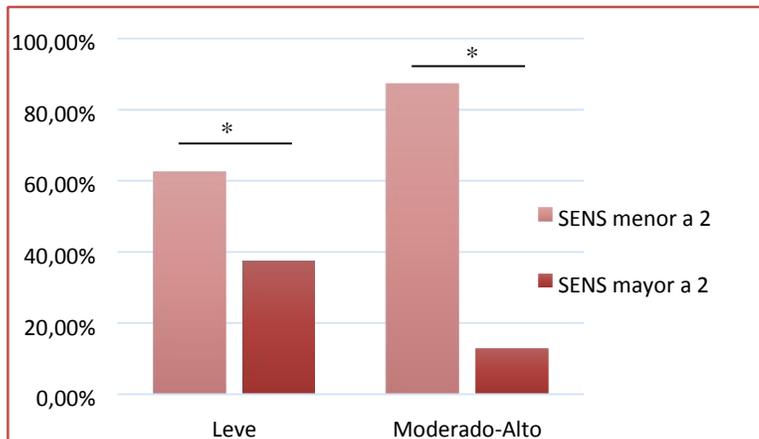
	Leve n=63 (100%)	Moderado n=63 (100%)	Alto n=63 (100%)	Valor p
SENS mayor a 2				
Menor a 2	9 (60,0)	17 (89,5)	11 (84,6)	0,094
Mayor a 2	6 (40,0)	2 (10,5)	2 (15,4)	
SENS mayor a 1				
Menor a 1	11 (73,3)	18 (94,7)	11 (84,6)	0,219
Menor a 2	4 (26,7)	1 (5,3)	2 (15,4)	
VSG				
Menor a 20	10 (66,7) 5	18 (72,0) 7	13 (56,5)	0,526
Mayor a 20	(33,3)	(28,0)	10 (43,5)	
PCR				
Menor a 3	6 (40,0)	8 (32,0)	12 (52,2)	0,363
Mayor a 3	9 (60,0)	17 (68,0)	11 (47,8)	
FR				
Menor a 20	7 (46,7)	9 (36,0)	6 (26,1)	0,425
Mayor a 20	8 (53,3)	16 (64,0)	17 (73,9)	
Anti CCP				
Menor a 20	9 (60,0)	13 (52,0)	12 (52,2)	0,866
Mayor a 20	6 (40,0)	12 (48,0)	11 (47,8)	
RA 33				
Menor a 25	13 (86,7)	23 (92,0)	23 (100,0)	0,234
Mayor a 25	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	

SENS (*Narrowing Simple Erosion Score*), DAS28: Disease activity score, VSG: Velocidad de sedimentación globular, PCR: Proteína C reactiva, FR: Factor Reumatoide, Anti-CCP: Anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados

Las características por subcategorías leve vs moderado/alto revelaron que pacientes con niveles moderados/altos de DKK-1 tienen ya un SENS mayor a 2 actualmente en un 12.4%, con asociaciones estadísticamente significativas ($p=0.050$) (**Tabla 7**).

Tabla 7. Comparaciones de los niveles leve vs moderado-alto de DKK en suero con las variables reumatológicas en el grupo de ARt

	Leve n=63 (100%)	Moderado – alto n=63 (100%)	Valor p
SENS mayor a 1			
Menor a 1	8 (50,0)	20 (64,5)	0,337
Mayor a 1	8 (50,0)	11 (35,5)	
SENS mayor a 2			
Menor a 2	10 (62,5)	27 (87,1)	0,050*
Mayor a 2	6 (37,5)	4 (12,9)	
VSG			
Menor a 20	11 (68,8)	30 (63,8)	0,721
Mayor a 20	5 (31,3)	17 (36,2)	
VSG			
Menor a 30	11 (68,8)	34 (72,3)	0,784
Mayor a 30	5 (31,3)	13 (27,7)	
PCR			
Menor a 3	7 (43,8)	19 (40,4)	0,816
Mayor a 3	9 (56,3)	28 (59,6)	
FR			
Menor a 20	7 (43,8)	15 (31,9)	0,391
Mayor a 20	9 (56,3)	32 (68,1)	
FR			
Menor a 60	12 (75,0)	30 (63,8)	0,413
Mayor a 60	4 (25,0)	17 (36,2)	
Anti CCP			
Menor a 20	9 (56,3)	25 (53,2)	0,832
Mayor a 20	7 (43,8)	22 (46,8)	
Anti CCP			
Menor a 60	10 (62,5)	34 (72,3)	0,459
Mayor a 60	6 (37,5)	13 (27,7)	
RA 33			
Menor a 25	14 (87,5)	45 (95,7)	0,243
Mayor a 25	2 (12,5)	2 (4,3)	



	Leve	Moderado-Alto
SENS menor a 2	62,50%	87,10%
SENS mayor a 2	37,50%	12,90%

La comparación de las subcategorías leve-moderado vs alto, identificaron que el 16.7% con niveles altos de DKK-1 en suero presentaban un SENS mayor a 2 y 22.9% tenían niveles leve-moderado de DKK-1 en suero con SENS mayor a 1, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 8**).

Tabla 8. Comparación entre los niveles leve-moderado vs alto de DKK-1 en suero con las variables reumatológicas en el grupo con ART

	Leve - Moderado n=63 (100%)	Alto n=63 (100%)	Valor p
SENS mayor a 1			
Mayor a 1	21 (60,0)	7 (58,3)	
Mayor a 2	14 (40,0)	5 (41,7)	0,919
SENS mayor a 2			
Menor a 2	27 (77,1)	10 (83,3)	
Mayor a 2	8 (22,9)	2 (16,7)	0,651

VSG			
Menor a 20			
Mayor a 20	9 (70,7)	12 (54,5)	
	12 (29,3)	10 (45,5)	0,199
VSG			
Menor a 30			
Mayor a 30	31 (75,6)	14 (63,6)	
	10 (24,4)	8 (36,4)	0,316
PCR			
Menor a 3			
Mayor a 3	15 (36,6)	11 (50,0)	
	26 (63,4)	11 (50,0)	0,303
FR			
Menor a 20			
Mayor a 20	16 (39,0)	6 (27,3)	
	25 (61,0)	16 (72,7)	0,351
FR			
Menor a 60			
Mayor a 60	27 (65,9)	15 (68,2)	
	14 (34,1)	7 (31,8)	0,852
Anti CCP			
Menor a 20			
Mayor a 20	22 (53,7)	12 (54,5)	
	19 (46,3)	10 (45,5)	0,946
Anti CCP			
Menor a 60			
Mayor a 60	26 (63,4)	18 (81,8)	
	15 (36,6)	4 (18,2)	0,129
RA 33			
Menor a 25			
Mayor a 25	37 (90,2)	22 (100,0)	
	4 (9,8)	0 (0,0)	0,130

La comparación realizada entre los niveles leve, moderado y alto de DKK-1 en suero con los títulos de anticuerpos anti-péptido carbamilados, arrojó los siguientes resultados, el 82,6% de los pacientes con niveles altos de DKK-1 en suero presentaban títulos mayores a 1/50 de anticuerpos anti-péptido 2 carbamilado, el 72,0% de aquellos con niveles moderados de DKK-1 en suero presentaron títulos mayores a 1/50 y el 60,0% de aquellos con niveles leves de DKK-1 presentaban títulos mayores a 1/50 de anticuerpos anti-péptido 2 carbamilado. Así mismo, los individuos con ARt que presentaban niveles altos de DKK-1 en suero tenían títulos mayores a 1/50 de anticuerpos anti-péptido 3 carbamilado en 69,6%, con niveles moderado en 76,0% y en niveles leves en 73,3% (**Tabla 9**).

Tabla 9. Comparar los niveles séricos leve, moderado y alto de DKK-1 con anticuerpos contra proteínas carbamiladas en el grupo de ARt

	Leve n=63 (100%)	Moderado n=63 (100%)	Alto n=63 (100%)	Valor p
Anticuerpo antipeptido 2				
Título 1/25				
Título 1/50	5 (33,3)	5 (20,0)	2 (8,7)	
Título 1/100	5 (33,3)	7 (28,0)	9 (39,1)	
Título 1/200	2 (13,3)	10 (40,0)	6 (26,1)	
Título 1/400	3 (20,0)	1 (4,0)	5 (21,7)	
	0 (0,0)	2 (8,0)	1 (4,3)	0,256
Anticuerpo antipeptido 2				
Negativo				
Positivo	8 (53,3)	10 (40,0)	9 (39,1)	
	7 (46,7)	15 (60,0)	14 (60,9)	0,642
Anticuerpo antipeptido 2				
Menor a 1/50				
Mayor a 1/50	6 (40,0)	7 (28,0)	4 (17,4)	
	9 (60,0)	18 (72,0)	19 (82,6)	0,305
Anticuerpo antipeptido 2				
Menor a 1/100				
Mayor a 1/100	10 (66,7)	12 (48,0)	11 (47,8)	
	5 (33,3)	13 (52,0)	12 (52,2)	0,447
Anticuerpo antipeptido 3				
Título 1/25				
Título 1/50	4 (26,7)	6 (24,0)	7 (30,4)	
Título 1/100	6 (40,0)	10 (40,0)	6 (26,1)	
Título 1/200	5 (33,3)	8 (32,0)	6 (26,1)	
Título 1/400	0 (0,0)	1 (4,0)	3 (13,0)	
	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,3)	0,677
Anticuerpo antipeptido 3				
Negativo				
Positivo	10 (66,7)	16 (64,0)	14 (60,9)	
	5 (33,3)	9 (36,0)	9 (39,1)	0,934
Anticuerpo antipeptido 3				
Menor a 1/50				
Mayor a 1/50	4 (26,7)	6 (24,0)	7 (30,4)	
	11 (73,3)	19 (76,0)	16 (69,6)	0,881
Anticuerpo antipeptido 3				
Menor a 1/100				
Mayor a 1/100	10 (66,7)	16 (64,0)	13 (56,5)	
	5 (33,3)	9 (36,0)	10 (43,5)	0,789

Positivo péptido 2 o péptido 3				
Péptido 2	6 (40,0)	9 (36,0)	7 (30,4)	0,824
Péptido 3	9 (60,0)	16 (64,0)	16 (69,6)	
Positivo péptido 2 o péptido 3				
NO	12 (80,0)	18 (72,0)	16 (69,6)	0,770
SI	3 (20,0)	7 (28,0)	7 (30,4)	

La comparación entre las subcategorías leve vs moderado/alto revelaron que pacientes con niveles moderados/altos de DKK-1 tenían positivo el péptido 2 en un 34,0% y presentan positividad en el péptido 3 en un 66,0% (**Tabla 10**), por otro lado en la subcategoría leve-moderado vs alto se identificó que aquellos con niveles leve/moderado presentaban positivo el péptido 3 en 63,4%, mientras que para el péptido 2 solo se encontró en el 36,6% (**Tabla 11**). Sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre las variables estudiadas.

Tabla 10. Asociación entre los niveles leve vs moderado-alto de DKK-1 con anticuerpos anti-péptido carbamilado en el grupo con ART

	Leve n=63 (100%)	Moderado – Alto n=63 (100%)	Valor p
Anticuerpo anti-péptido 2			
Título 1/25	5 (31,3)	7 (14,9)	0,441
Título 1/50	5 (31,3)	16 (34,0)	
Título 1/100	3 (18,8)	15 (31,9)	
Título 1/200	3 (18,8)	6 (12,8)	
Título 1/400	0 (0,0)	3 (6,4)	
Anticuerpo anti-péptido 2			
Negativo	8 (50,0)	19 (40,4)	0,504
Positivo	8 (50,0)	28 (59,6)	
Anticuerpo anti-péptido 2			
Menor a 50	6 (37,5)	11 (23,4)	0,273
Mayor a 50	10 (62,5)	36 (76,6)	
Anticuerpo anti-péptido 2			
Menor a 100	10 (62,5)	23 (48,9)	0,348
Mayor a 100	6 (37,5)	24 (51,1)	

Anticuerpo anti-péptido 3			
Título 1/25	5 (31,3)	12 (25,5)	
Título 1/50	6 (37,5)	16 (34,0)	
Título 1/100	5 (31,3)	14 (29,8)	
Título 1/200	0 (0,0)	4 (8,5)	
Título 1/400	0 (0,0)	1 (2,1)	0,755
Anticuerpo anti-péptido 3			
Negativo	11 (68,8)	29 (61,7)	
Positivo	5 (31,3)	18 (38,3)	0,613
Anticuerpo anti-péptido 3			
Menor a 50	5 (31,3)	12 (25,5)	
Mayor a 50	11 (68,8)	35 (74,5)	0,656
Anticuerpo anti-péptido 3			
Menor a 100	11 (68,8)	28 (59,6)	
Mayor a 100	5 (31,3)	19 (40,4)	0,514
Positivo péptido 2 o péptido 3			
Péptido 2			
Péptido 3	6 (37,5)	16 (34,0)	
	10 (62,5)	31 (66,0)	0,802
Positivo péptido 2 o péptido 3			
NO			0,390
SI	13 (81,3)	33 (70,2)	
	3 (18,8)	14 (29,8)	

Tabla 11. Asociación entre los niveles leve-moderado vs alto de DKK-1 con anticuerpos anti-péptido carbamilado en el grupo con ART

	Leve _ Moderado n=63 (100%)	Alto n=63 (100%)	Valor p
Anticuerpo anti-péptido 2			
Título 1/25	10 (24,4)	2 (9,1)	
Título 1/50	12 (29,3)	9 (40,9)	
Título 1/100	13 (31,7)	5 (22,7)	0,350
Título 1/200	4 (9,8)	5 (22,7)	
Título 1/400	2 (4,9)	1 (4,5)	
Anticuerpo anti-péptido 2			
Negativo	18 (43,9)	9 (40,9)	
Positivo	23 (56,1)	13 (59,1)	0,819

Anticuerpo anti-péptido 2			
Menor a 1/50	13 (31,7)	4 (18,2)	0,249
Mayor a 1/50	28 (68,3)	18 (81,8)	
Anticuerpo anti-péptido 2			
Menor a 1/100	22 (53,7)	11 (50,0)	0,782
Mayor a 1/100	19 (46,3)	11 (50,0)	
Anticuerpo anti-péptido 3			
Título 1/25	11 (26,8)	6 (27,3)	0,253
Título 1/50	16 (39,0)	6 (27,3)	
Título 1/100	13 (31,7)	6 (27,3)	
Título 1/200	1 (2,4)	3 (13,6)	
Título 1/400	0 (0,0)	1 (4,5)	
Anticuerpo anti-péptido 3			
Negativo	27 (65,9)	13 (59,1)	0,595
Positivo	14 (34,1)	9 (40,9)	
Anticuerpo anti-péptido 3			
Menor a 1/50	11 (26,8)	6 (27,3)	0,970
Mayor a 1/50	30 (73,2)	16 (72,7)	
Anticuerpo anti-péptido 3			
Menor a 1/100	27 (65,9)	12 (54,5)	0,378
Mayor a 1/100	14 (34,1)	10 (45,5)	
Positivo péptido 2 o péptido 3			
Péptido 2			0,705
Péptido 3	15 (36,6)	7 (31,8)	
	26 (63,4)	15 (68,2)	
Positivo péptido 2 o péptido 3			
NO			0,527
SI	31 (75,6)	15 (68,2)	
	10 (24,4)	7 (31,8)	

En cuanto a las variables clínicas reumatológicas aquellos que presentaban niveles leves de DKK-1 manifestaron tener más de una articulación dolorosa para en el 93,3%, el 80,0% con niveles moderados y el 60,9% con niveles altos tenían más de una articulación dolorosa. Se identificó más de una articulación inflamada en 86,7% pacientes con categoría leve de DKK-1, 76,0% con niveles moderados y 60,9% con niveles altos de DKK-1 en suero.

La asociación entre los niveles de DKK-1 en suero y las variables de actividad articular arrojó que aquellos con niveles leves de DKK-1 el 86,7% presentaba DAS28-VSG mayor a 3,2, los que tenían niveles moderados de DKK-1 el 72,0%

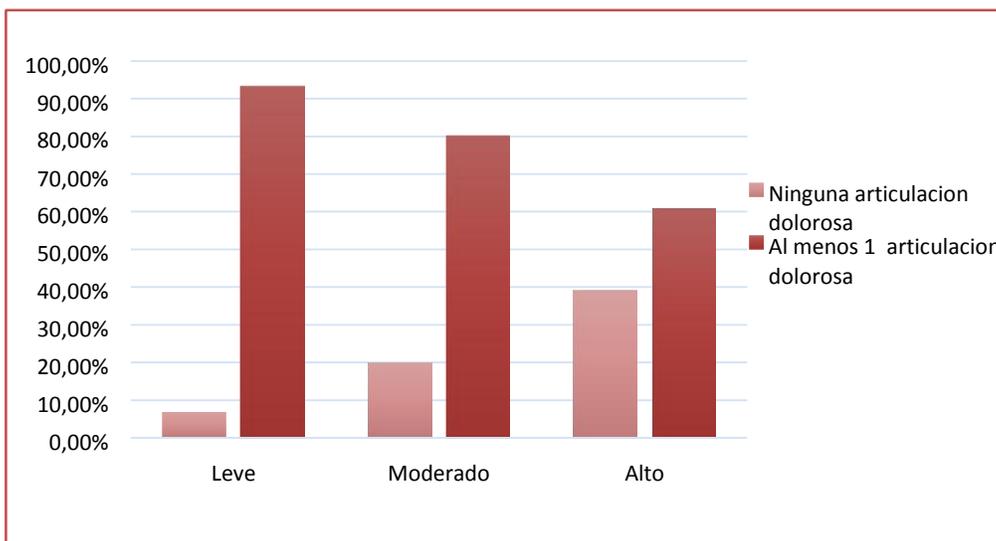
presentaba DAS28-VSG mayor a 3,2 y los que tenían niveles altos de DKK-1 el 73,9% presentaba DAS28-VSG mayor a 3,2. En cuanto al índice VAS, el 33,3% con niveles leves de DKK-1, el 36,0% con niveles moderados y el 43,5% con niveles altos tuvieron un valor mayor a 50 para el índice VAS. No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre los niveles de DKK-1 y los índices de actividad reumatológica (**Tabla 12 y 13**).

Tabla 12. Asociación entre los niveles leve, moderado y alto de DKK-1 en suero con marcadores e índices de actividad reumatológica en pacientes con ARt

	Leve n=63 (100%)	Moderado n=63 (100%)	Alto n=63 (100%)	Valor p
Articulaciones dolorosas				
Ninguna	1 (6,7)	5 (20,0)	9 (39,1)	0,061
Mayor a 1	14 (93,3)	20 (80,0)	14 (60,9)	
Articulaciones inflamadas				
Ninguna	2 (13,3)	6 (24,0)	9 (39,1)	0,197
Mayor a 1	13 (86,7)	19 (76,0)	14 (60,9)	
DAS28 VSG				
Menor a 2,6	1 (6,7)	4 (16,0)	5 (21,7)	0,642
2,6-3,2	1 (6,7)	3 (12,0)	1 (4,3)	
Mayor a 3,2	13 (86,7)	18 (72,0)	17 (73,9)	
VAS				
Menor a 50	10 (66,7)	16 (64,0)	13 (56,5)	0,789
Mayor a 50	5 (33,3)	9 (36,0)	10 (43,5)	
HAQ				
Menor a 1	3 (20,0)	13 (52,0)	11 (47,8)	0,154
1,1 – 2	3 (20,0)	1 (4,0)	3 (13,0)	
2,1 – 3	2 (13,3)	0 (0,0)	3 (13,0)	
Mayor a 3	7 (46,7)	11 (44,0)	5 (21,7)	
4,00	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,3)	
RAPID				
Menor a 12	0 (0,0)	1 (4,0)	3 (13,0)	0,328
6,1 - 12	9 (60,0)	13 (52,0)	8 (34,8)	
3,1 - 6	4 (26,7)	4 (16,0)	8 (34,8)	
Mayor a 3	2 (13,3)	7 (28,0)	4 (17,3)	
SDAI				
Menor a 3,3	0 (0,0)	2 (8,0)	1 (4,3)	0,805
3,3 – 11	3 (20,0)	6 (24,0)	6 (26,1)	
Mayor a 11	12 (80,0)	17 (68,0)	16 (69,6)	

IMC					
Menor a 25	7 (46,7)	11 (44,0)	12 (52,2)		0,985
25 – 30	6 (40,0)	10 (40,0)	8 (34,8)		
Mayor a 30	2 (13,3)	4 (16,0)	3 (13,0)		

DAS 28 VSG (Disease Activity Score) VAS (Visual Analogue Scales) HAQ (Health Assessment Questionnaire) SDAI (Simple Disease Activity Index) IMC (Índice de Masa Corporal)



	Leve	Moderado	Alto
Ninguna articulación dolorosa	6,70%	20,00%	39,10%
Al menos 1 articulación dolorosa	93,30%	80,00%	60,90%

Tabla 23. Asociación entre las subcategorías leve vs moderado-alto de DKK-1 en suero con marcadores e índices de actividad reumatológica en pacientes con ARt

	Leve n=63 (100%)	Moderado – Alto n=63 (100%)	Valor p
Articulaciones dolorosas			
Ninguna	2 (12,5)	13 (27,7)	0,219
Mayor a 1	14 (87,5)	34 (72,3)	
Articulaciones inflamadas			
Ninguna	3 (18,8)	14 (29,8)	0,390
Mayor a 1	13 (81,3)	33 (70,2)	

DAS 28 VSG			
Menor a 2,6	2 (12,5)	8 (17,0)	0,860
2,6-3,2	1 (6,3)	4 (8,5)	
Mayor a 3,2	13 (81,3)	35 (74,5)	
DAS28			
Menor a 3,2	4 (25,0)	19 (40,4)	0,268
Mayor a 3.2	12 (75,0)	28 (59,6)	
VAS			
Menor a 20	11 (68,8)	28 (59,6)	0,514
Mayor a 20	5 (31,3)	19 (40,4)	
HAQ			
Menor a 1	4 (25,0)	23 (48,9)	0,415
1,1 – 2	3 (18,8)	4 (8,5)	
2,1 – 3	2 (12,5)	3 (6,4)	
Mayor a 3	7 (43,8)	17 (36,1)	
SDAI			
Menor a 3,3	0 (0,0)	3 (6,4)	0,585
3,3 – 11	4 (25,0)	11 (23,4)	
Mayor a 11	12 (75,0)	33 (70,2)	
IMC			
Menor a 25	7 (43,8)	23 (48,9)	0,863
De 25 a 30	7 (43,8)	17 (36,2)	
Mayor a 30	2 (12,5)	7 (14,9)	

La comparación de las subcategorías leve-moderado y alto de DKK-1 en suero con los marcadores e índices de actividad reumática, evidencio que los individuos con niveles leve-moderados de DKK-1 presentaban más de una articulación dolorosa en 34 (82,9%) y con niveles altos 14 (63,6%) presentaban al menos una articulación dolorosa. Por otra parte se identificó 32 (78,0%) con niveles moderado-alto con más de una articulación inflamada y 14 (63,6%) con niveles altos sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 14**).

Tabla 14. Asociación entre las subcategorías leve-moderado vs alto de DKK-1 en suero con marcadores e índices de actividad reumatológica en pacientes con ARt

	Leve – Moderado n=63 (100%)	Alto n=63 (100%)	Valor p
Articulaciones dolorosas			
Ninguna	7 (17,1)	8 (36,4)	0,087
Mayor a 1	34 (82,9)	14 (63,6)	

Articulaciones inflamadas			
Ninguna			0,219
Mayor a 1	9 (22,0)	8 (36,4)	
	32 (78,0)	14 (63,6)	
DAS 28 VSG			
Menor a 2,6	6 (14,6)	4 (18,2)	0,738
2,6-3,2	4 (9,8)	1 (4,5)	
Mayor a 3,2	31 (75,6)	17 (77,3)	
DAS28			
Menor a 3,2	15 (36,6)	8 (36,4)	0,986
Mayor a 3,2	26 (63,4)	14 (63,6)	
VAS			
Menor a 20	27 (65,9)	12 (54,5)	0,378
Mayor a 20	14 (34,1)	10 (45,5)	
HAQ			
Menor a 1	17 (41,5)	10 (45,5)	0,262
1,1 – 2	4 (9,8)	3 (13,6)	
2,1 – 3	2 (4,9)	3 (13,6)	
Mayor a 3	18 (43,9)	6 (27,2)	
RAPID			
Menor a 12	1 (2,4)	3 (13,6)	0,253
6,1 - 12	22 (53,7)	8 (36,4)	
3,1,6	9 (22,0)	7 (31,8)	
Mayor a 3	9 (22,0)	4 (18,1)	
SDAI			
Menor a 3,3	2 (4,9)	1 (4,5)	0,986
3,3 – 11	10 (24,4)	5 (22,7)	
Mayor a 11	29 (70,7)	16 (72,7)	
IMC			
Menor a 25	18 (43,9)	12 (54,5)	0,705
De 25 a 30	17 (41,5)	7 (31,8)	
Mayor a 30	(14,6)	3 (13,6)	

5. DISCUSIÓN

La erosión ósea es una característica central de la AR y está asociada con la gravedad de la enfermedad y un pobre resultado funcional, este desbalance entre osteoformación y reabsorción lleva a la pérdida de hueso cortical, caracterizándose por la presencia de pequeñas irregularidades en la superficie del hueso (63, 98). Actualmente el mejor predictor de erosión ósea en AR temprana se hace mediante evaluaciones radiográficas, sin embargo el uso de biomarcadores predictivos que expresen la progresión estructural de la enfermedad son muy restringidos en la práctica clínica (99). En hallazgos recientes se han encontrado mecanismos patogénicos relacionados con la pérdida ósea, como es el caso de la proteína Dickkopf-1 (DKK-1), debido a que se han encontrado niveles elevados en suero del marcador DKK-1 en patologías asociadas con resorción ósea como la AR (8, 17). Por lo tanto podría considerarse como un nuevo biomarcador de pronóstico en individuos con AR temprana.

Según los resultados del presente trabajo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles leve, moderado o alto de DKK-1 con la actividad de la enfermedad medida por DAS28 o SDAI, HAQ, RAPID III o VAS. Sin embargo, si se encontró asociaciones estadísticamente significativas con la presencia de progresión radiológica precedida por la variable SENS con $p=0.050$, método de puntuación empleado para evaluar el daño estructural en las radiografías de pacientes con AR (100), lo cual tiene relación con el aumento de los niveles de DKK-1 en relación con la disminución de la densidad ósea presente en los mismos, evidenciando así la progresión de daño óseo en los pacientes con niveles moderado o alto de DKK-1 (101). El Score SENS mayor a 2 se correlacionó con los niveles de DKK-1 en suero, nos puede indicar que la proteína DKK-1 podría considerarse como un biomarcador de resorción ósea y daño articular en pacientes con AR de reciente inicio.

En concordancia con estos resultados autores como Garnero y colaboradores encontraron que el aumento de DKK-1 sérico se asoció con un mayor riesgo de

progresión ósea evidenciada por los cambios en la puntuación radiológica (97, 102). Sin embargo, la literatura existen hallazgos inconsistentes donde demuestran asociación entre DKK-1 y el daño radiológico (8, 102), mientras que otros estudios no describen dicha asociación (19, 103, 109).

Entre las manifestaciones clínicas más evidentes en los individuos con AR es el daño articular y discapacidad, dicha destrucción articular puede presentarse en etapas tempranas del curso de la enfermedad y avanzar a diferentes velocidades, entre esto una de las características más notorias en estos pacientes son el dolor articular que presentan en el desarrollo de sus actividades diarias (104, 105). A pesar que no se encontró diferencias estadísticamente significativa, se observó una tendencia entre los niveles séricos leve, moderado y alto de DKK-1 y las articulaciones dolorosas ($p= 0.061$), lo cual es concordante con la descripción de la enfermedad como lo informan Kahlenberg J y colaboradores (21).

Por otra parte no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles séricos leve, moderados o altos de DKK-1 con niveles aumentados de FR, anti-CCP o reactantes de fase aguda (PCR, VSG), no obstante, la descripción de la enfermedad en los pacientes concuerda con la clínica establecida en pacientes con AR, ya que los valores de FR, anti-CCP, PCR, VSG se encontraron aumentados en dichos pacientes, sin asociarse con los niveles séricos de DKK, por lo tanto no se asoció con la actividad de la enfermedad, pero si con compromiso óseo debido a su asociación con SENS. De igual modo la presencia del sexo femenino sobre el masculino en cuanto a la presencia de la enfermedad es mayor y esto se debe posiblemente a la producción de estrógenos, ya que autores manifiestan el papel de esta hormona en la modulación de la respuesta inmune y una incidencia de 2– 10 veces mayor en el desarrollo de enfermedades inflamatorias y autoinmunes (106, 107, 108).

En contraste con los resultados encontrados, hay estudios donde demuestran asociación entre los niveles elevados de anti CCP y reactantes de fase aguda con niveles aumentados de DKK-1 y una elevada progresión radiográfica como lo

encontrado por Seror y colaboradores, donde el aumento del nivel sérico de DKK-1 se asoció con una expresión aumentada de la actividad de la enfermedad, presencia de erosiones óseas y reactantes de fase aguda (8). Sin embargo, otros estudios no mostraron ninguna asociación con los niveles de DKK-1 y las variables de laboratorio expuestas anteriormente como lo explica Wechalekar y colaboradores no encontraron asociación entre los niveles altos de DKK-1 y la presencia de erosiones óseas (109).

A pesar de no encontrarse asociaciones estadísticamente significativas entre DKK1 y marcadores de actividad de la enfermedad, esto podría deberse al número de individuos que participaron en el estudio, la heterogeneidad de las diferentes poblaciones, esto debido a que la mayoría de pacientes era procedente de otras ciudades, el punto de corte de evolución de la AR en los pacientes, todos estos factores podrían haber jugado un papel importante en los resultados. En estudios recientes, se ha informado que los niveles séricos de DKK-1 están implicados en la etiología de la AR y desempeñan un papel importante en la disminución de la densidad ósea (8, 102, 109). Igualmente otros estudios que describen esta asociación como Wang S et al (19) y Rossini M et al (110), encontrando la presencia de niveles altos de DKK-1 y erosiones óseas evaluadas por el índice SHS en pacientes con AR establecida, por lo tanto podría estar relacionado con los estadios de la enfermedad, ya que en etapas avanzadas de la enfermedad es mayor la presencia de erosiones ósea, por lo cual es más evidente el papel que cumple la proteína DKK-1. Cabe resaltar que nuestro estudio se realizó con individuos de AR con menos de dos años de evolución, siendo este uno de los posibles motivos que no se encontrara aumentada en gran medida la proteína en nuestros pacientes, afectado así el resultado.

6. CONCLUSIONES

La proteína DKK-1 cumple importantes funciones en la formación ósea, por lo cual su aumento en pacientes con artritis reumatoide temprana puede conllevar a la

aparición de erosiones óseas y daño articular en los pacientes, aunque no se obtuvo asociaciones estadísticamente significativas entre las categorías leve, moderado y alto de niveles séricos de DKK-1 en suero con marcadores reumatológicos como el FR, anti-CCP y reactantes de fase aguda (PCR y VSG), estos si fueron concordantes los resultados de estos marcadores con la descripción de la enfermedad, posiblemente la proteína DKK-1 tendría más protagonismo en estadios más avanzados de la enfermedad, donde se puede evidenciar el daño óseo en los pacientes.

La evaluación sérica de los niveles de la proteína DKK1 es bueno para establecer el daño progresivo articular visible por radiología, aunque carece de capacidad diagnóstica en el desarrollo de la enfermedad en fases tempranas.

La actividad de la enfermedad medida por DAS28, HAQ, VAS, RAPID 3 y SDAI, no presentó ninguna asociación con los niveles de DKK-1 de los pacientes con ARt estudiadas, esto puede deberse a que son pacientes de reciente comienzo con apenas 2 años de evolución de la enfermedad. Sin embargo si se encontró el Score SENS mayor a 2 en correlación con los niveles de DKK-1 en suero, siendo este un índice de puntaje de daño radiológico, nos puede indicar que la proteína DKK-1 podría considerarse como un biomarcador de resorción ósea y daño articular en pacientes con AR.

En este sentido es recomendable que se aumente el tamaño de la muestra, el tiempo de progreso de la enfermedad, ya que en nuestro caso los pacientes no tenían un diagnóstico mayor a dos años de AR, teniendo así poca actividad de la enfermedad, por lo cual esto podrían haber interferido en los resultados, debido a que no presentaban mayor daño radiológico, siendo así importante ampliar los estudios en etapas más avanzadas de la enfermedad. El papel de DKK-1 como regulador de la densidad mineral ósea en pacientes con ARt requiere mayor investigación para poder determinar su papel en estadios tempranos de la AR en relación con los índices de actividad de la enfermedad.

7. REFERENCIAS

1. McInnes I. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*. 2011;365:2205–19.
2. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010;62(9):2569-2581.
3. Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, et al; National Arthritis Data Workgroup. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis Rheum*. 2008;58(1):15-25.
4. Schellekens GA, De Jong BAW, Van Den Hoogen FHJ, Van De Putte LBA, Van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*. 1998;101(1):273–81
5. Mc Ardle A, Flatley B, Pennington SR, FitzGerald O. Early biomarkers of joint damage in rheumatoid and psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:141.
6. Chou C, Liao H, Chen C, Chen W, Wang H, Su K. The Clinical Application of Anti-CCP in Rheumatoid Arthritis and Other Rheumatic Diseases. *Biomark Insights*. 2007;2(201):165–71
7. Brink M, Verheul MK, Rönnelid J, Berglin E, Holmdahl R, Toes REM, et al. Anti-carbamylated protein antibodies in the pre-symptomatic phase of rheumatoid arthritis, their relationship with multiple anti-citrulline peptide antibodies and association with radiological damage. *Arthritis Res Ther*. 2015;17:25
8. Seror R, Boudaoud S, Pavy S, Nocturne G, Schaeffer T, Saraux A, et al. Increased Dickkopf-1 in Recent-onset Rheumatoid Arthritis is a New Biomarker of Structural Severity. Data from the ESPOIR Cohort. *Sci Rep*. 2016;6(November 2015):18421.
9. Burska A, Boissinot M, Ponchel F. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014.

10. Chang K, Yang SM, Kim SH, Han KH, Park SJ, Shin J II. Smoking and rheumatoid arthritis. *Int J Mol Sci.* 2014;15(12):22279–95.
11. García-Arias M, Pascual-Salcedo D, Ramiro S, Ueberschlag M-E, Jermann TM, Cara C, et al. Calprotectin in rheumatoid arthritis : association with disease activity in a cross-sectional and a longitudinal cohort. *Mol Diagn Ther [Internet].* 2013;17(1):49–56
12. Aho K, Palosuo T, Raunio V, Puska P, Aromaa A, Salonen JT. When does rheumatoid disease start? *Arthritis Rheum.* 1985;28(5):485–9.
13. Berglin E, Padyukov L, Sundin U, Hallmans G, Stenlund H, Van Venrooij WJ, et al. A combination of autoantibodies to cyclic citrullinated peptide (CCP) and. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(4):R303-308.
14. Fuggle NR, Smith TO, Kaul A, Sofat N. Hand to mouth: A systematic review and meta-analysis of the association between rheumatoid arthritis and periodontitis. *Front Immunol.* 2016;7(MAR)
15. Pecani A, Alessandri C, Spinelli FR, Colasanti T, Pendolino M, Barbati C, et al. Prevalence, sensitivity and specificity of antibodies against carbamylated proteins in a large cohort of Italian rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis.* 2016;75:675.
16. Shi J, van Steenberg HW, van Nies JAB, Levarht EWN, Huizinga TWJ, van der Helm-van Mil AHM, et al. The specificity of anti-carbamylated protein antibodies for rheumatoid arthritis in a setting of early arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2015;17(1):339.
17. Daoussis D, Andonopoulos AP. The Emerging Role of Dickkopf-1 in Bone Biology: Is It the Main Switch Controlling Bone and Joint Remodeling? *Semin Arthritis Rheum.* 2011;41(2):170–7.
18. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med.* 2007;13(2):156–63.
19. Wang SY, Liu YY, Ye H, Guo JP, Li RU, Liu X, et al. Circulating dickkopf-1 is correlated with bone erosion and inflammation in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2011;38(5):821–7.
20. de Rooy DPC, Yeremenko NG, Wilson AG, Knevel R, Lindqvist E, Saxne T, et al. Genetic studies on components of the Wnt signalling pathway and the severity of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2013;72(5):769–75.

21. Kahlenberg JM, Fox DA. Advances in the medical treatment of rheumatoid arthritis. Vol. 27, Hand Clinics. 2011. p. 11–20
22. Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2002;4(suppl 3):S265-S272.)
23. Anaya JM. Genes y artritis reumatoidea. *Rev Colomb Reumatol* 1999;6:24050
24. Verheijden GFM, Rijnders AWM, Bos E, Coenen-deRoo CJJ, van Staveren CJ, Miltenburg AMM, et al. Human cartilage glycoprotein-39 as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 40:1115-25.
25. Shi J, Knevel R, Suwannalai P, van der Linden MP, Janssen GMC, van Veelen P a., et al. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(42):17372–7
26. Gerlag DM, Raza K, van Baarsen LGM, Brouwer E, Buckley CD, Burmester GR, et al. EULAR recommendations for terminology and research in individuals at risk of rheumatoid arthritis: report from the Study Group for Risk Factors for Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(5):638–41
27. Francesca Ingegnoli, Roberto Castelli, Roberta Gualtierotti. Rheumatoid Factors: Clinical Applications. *Dis Markers.* 2013; 35(6): 727–734
28. Y.W. Song E.H. Kang. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *QJM: An International Journal of Medicine*, Volume 103, Issue 3, 1 March 2010, Pages 139–146
29. O. M. R. Westwood P. N. Nelson F. C. Hay. Rheumatoid factors: what's new? *Rheumatology*, Volume 45, Issue 4, 1 April 2006, Pages 379–385
30. Haberman AM, William J, Euler C, Shlomchik MJ. Rheumatoid factors in health and disease: structure, function, induction and regulation. *Current Directions in Autoimmunity.* 2003;6:169–195
31. Annette HM van der Helm-van Mil, Kirsten N Verpoort, Ferdinand C Breedveld, René EM Toes, Tom WJ Huizinga. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7(5): R949–R958.

32. Kroot EJ et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000 Aug;43(8):1831-5.
33. D M Lee, P H Schur. Clinical utility of the anti-CCP assay in patients with rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2003;62:870–874
34. Masson-Bessière C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Vossenaar ER1, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease.
35. Valesini G, Gerardi MC, Iannuccelli C, Pacucci VA, Pendolino M, Shoenfeld Y. Citrullination and autoimmunity. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2015 Jun;14(6):490–7.
36. Linn-Rasker SP. Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2006 Mar 1;65(3):366–71.
37. Pedersen M, Jacobsen S, Garred P, Madsen HO, Klarlund M, Svejgaard A, et al. Strong combined gene–environment effects in anti–cyclic citrullinated peptide–positive rheumatoid arthritis: A nationwide case–control study in Denmark. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2007 May;56(5):1446–53.
38. Senshu T, et al. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deaminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol.* 2001;166:4177–84
39. Koivula MK, Aman S, Karjalainen A, Hakala M, Risteli J. Are there autoantibodies reacting against citrullinated peptides derived from type I and type II collagens in patients with rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis.* 2005;64:1443–50.
40. Vossenaar ER, Despres N, Lapointe E, van der Heijden A, Lora M, Senshu T, et al. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther.* 2004;6:R142–50
41. Zeneng Wang et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nature Medicine* 13, 1176 - 1184 (2007)
42. Jing Shi et al. Carbamylation and antibodies against carbamylated proteins in autoimmunity and other pathologies. *Autoimmunity Reviews* 13 (2014) 225–230

43. Arbi Pecani et al. Prevalence, sensitivity and specificity of antibodies against carbamylated proteins in a monocentric cohort of patients with rheumatoid arthritis and other autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2016; 18: 276
44. Trouw LA, Mahler M. Closing the serological gap: promising novel biomarkers for the early diagnosis of rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* 2012 Dec; 12(2):318-22
45. M. Holzer, K. Zangger, D. El-Gamal, V. Binder, S. Curcic, V. Konya, et al. Myeloperoxidase-derived chlorinating species induce protein carbamylation through decomposition of thiocyanate and urea: novel pathways generating dysfunctional high-density lipoprotein *Antioxid Redox Signal*, 17 (2012), pp. 1043-1052
46. Nzeusseu Toukap A et al. Myeloperoxidase and its products in synovial fluid of patients with treated or untreated rheumatoid arthritis. *Free Radic Res.* 2014 Apr; 48(4):461-5.
47. Z. Prokopowicz, J. Marcinkiewicz, D.R. Katz, B.M. Chain. Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 60 (2012), pp. 43-54
48. Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol.* 1983; 34():141-212
49. Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest.* 2003 Jun; 111(12):1805-12
50. Harnett W, Harnett MM. Phosphorylcholine: friend or foe of the immune system? *Immunol Today.* 1999 Mar; 20(3):125-9.
51. Volanakis JE, Wirtz KW. Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers. *Nature.* 1979 Sep 13; 281(5727):155-7
52. Gershov D, Kim S, Brot N, Elkon KB. C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate

immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med.* 2000 Nov 6; 192(9):1353-64.

53. Pepys MB, Rowe IF, Baltz ML. C-reactive protein: binding to lipids and lipoproteins. *Int Rev Exp Pathol.* 1985; 27:83-111.
54. Carolyn Mold, Henry Gewurz, Terry W Du Clos. Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology.* 1999 May;42(13):23-30.
55. Katherine B Bodman-Smith et al. C-reactive protein-mediated phagocytosis and phospholipase D signalling through the high-affinity receptor for immunoglobulin G (FcγRI). *Immunology.* 2002 Oct; 107(2): 252–260.
56. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999 Feb 11; 340(6):448-54
57. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 Jan 14; 340(2):115-26.
58. Renuka Devi Ramamoorthy, Vijaykumar Nallasamy, Raghavendra Reddy, Nalini Esther, Yuvaraja Maruthappan. A review of C-reactive protein:
A diagnostic indicator in periodontal medicine. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012 Aug; 4(Suppl 2): S422–S426
59. Nancy A. Shadick et al. C-Reactive Protein in the Prediction of Rheumatoid Arthritis in Women. *Arch Intern Med.* 2006;166(22):2490-2494
60. Tishler M, Caspi D, Yaron M. C-reactive protein levels in patients with rheumatoid arthritis: the impact of therapy. *Clin Rheumatol* 1985;43:21-324
61. Kyoung-Woon Kim, Bo-Mi Kim, Hee-Won Moon, Sang-Heon Lee and HaeRim Kim. Role of C-reactive protein in osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 2015;17:41.
62. Masi AT, Aldag JCS, Pines J. Do elevated levels of serum C-reactive protein predict rheumatoid arthritis in men: correlations with pre-RA status and baseline positive rheumatoid factors. *J Rheumatol* 2001;28:2359- 2361

63. Schett, G, & Gravallesse, E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev. Rheum* 2012;8(11): 656–664.
64. Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic control of bone formation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2009; 25:629–648
65. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003; 423:337–342
66. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat. Rev. Genet.* 2003;4:638–649
67. Firestein GS, et al. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. I. Failure to detect T cell lymphokines (interleukin 2 and interleukin 3) and presence of macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and a novel mast cell growth factor in rheumatoid synovitis. *J. Exp. Med.* 1988;168:1573–1586.
68. Gravallesse EM, et al. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum.* 2000;43:250–258.
69. Shigeyama Y, et al. Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43:2523–2530.
70. Visser H, le Cessie S, Vos K, Breedveld FC, Hazes JM. How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46:357–365.
71. Kastbom A, Strandberg G, Lindroos A, Skogh T. Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project) *Ann. Rheum. Dis.* 2004;63:1085–1089.
72. Meyer O, et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann. Rheum. Dis.* 2003;62:120–126.
73. Schett G, Saag KG, Bijlsma JW. From bone biology to clinical outcome: state of the art and future perspectives. *Ann. Rheum. Dis.* 2010;69:1415– 1419.

74. Harre U, et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J. Clin. Invest.* 2012;122:1791– 1802.
75. Walsh NC1, Gravallese EM. Bone remodeling in rheumatic disease: a question of balance. *Immunol Rev.* 2010 Jan;233(1):301-12
76. Machold, K., Stamm, T., Nell, V., Pflugbeil, S., Aletaha, D., Steiner, G., Uffmann, M. and Smolen, J. (2006). Very recent onset rheumatoid arthritis: clinical and serological patient characteristics associated with radiographic progression over the first years of disease. *Rheumatology*, 46(2), pp.342349.
77. Thabet MM, Huizinga TW, van der Heijde DM, van der Helm-van Mil AH.
The prognostic value of baseline erosions in undifferentiated arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009; 11:R155
78. Miao CG et al. Wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling. *Cell Signal.* 2013 Oct;25(10):2069-78.
79. Li J, Sarosi I, Cattle RC, Pretorius J, Asuncion F, Grisanti M et al. Dkk1 mediated inhibition of Wnt signaling in bone results in osteopenia. *Bone.* 2006;39(4):754-66.
80. M. Sen. Wnt signalling in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 44 (2005), pp–713
81. Daoussis Dimitrios, et al. Evidence That Dkk-1 Is Dysfunctional in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis & Rheumatism.* 2010; 62 (1): 150–158
82. de Rooy DP, Yeremenko NG, Wilson AG, et al. Genetic studies on components of the Wnt signalling pathway and the severity of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:769–75.
83. Nusse R., Varmus H.E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* (1982) 31:99–109
84. Van Ooyen A., Nusse R. Structure and nucleotide sequence of the putative mammary oncogene int-1; proviral insertions leave the protein-encoding domain intact. *Cell* (1984) 39:233–240.

85. Cabrera C.V., Alonso M.C., Johnston P., Phillips R.G., Lawrence P.A. (1987) Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene. *Cell* 50:659–663.
86. Miller JR. The Wnts. *Genome Biol*, 3 (2002), pp. reviews3001.
87. Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14 (1998), pp. 59-88
88. Ken M. Cadigan, Roel Nusse. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes & Dev*. 1997. 11:3286-3305
89. M. Sen. Wnt signalling in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 44 (2005), pp–713
90. Cheng-gui Miao et al, Wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling. *Cell Signal* 2013;25:2069-2078
91. Michael D. Gordon, Roel Nusse. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry* 2006 281, 22429-22433.
92. Velasco J, Riancho J. La vía Wnt y el hueso. *Rev Esp Enferm metab oseas* 2008;117:5-9
93. Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*, 25 (2006), pp. 7469-81
94. Danielle Diarra et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nature medicine* 2007
95. Glinka A, Wu W, Dellus H, Monaghan P, Blumenstock C, Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 1998;391:357-362
96. Bafico A1, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol*. 2001 Jul;3(7):683-6.

97. Prevoo ML et al. Modified disease activity scores that include twenty-eightjoint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995 Jan;38(1):44-8.
98. Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic control of bone formation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2009; 25:629–648
99. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003; 423:337–342
100. Dias E, Lukas C, Landewe R, Fatenejad S, van der Heijde D. Reliability and sensitivity to change of the Simple Erosion Narrowing Score compared with the Sharp-van der Heijde method for scoring radiographs in rheumatoid arthritis. 2018.
101. Chaparro del Moral R, Rillo O, Casalla L, Morón C, Citera G, Cocco J et al. Work Productivity in Rheumatoid Arthritis: Relationship with Clinical and Radiological Features. *Arthritis.* 2012;2012:1-7.
102. Garnero P, Tabassi N, Voorzanger-Rousselot N. Circulating Dickkopf-1 and Radiological Progression in Patients with Early Rheumatoid Arthritis Treated with Etanercept. *The Journal of Rheumatology.* 2008;35(12):2313.
103. Gómez-Vaquero C, Martín I, Loza E, Carmona L, Ivorra J, Narváez JA et al. Effect of Osteoprotegerin and Dickkopf-Related Protein 1 on Radiological Progression in Tightly Controlled Rheumatoid Arthritis. *PLoS One.* 2016;11(12):e0166691
104. Harris ED Jr. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990;322:1277–89.
105. Baratelle AM, van der Heijde D. Radiographic imaging end points in rheumatoid arthritis trials. In: Reid DM, Miller CG, editors. *Clinical trials in rheumatoid arthritis and osteoarthritis.* London: Springer-Verlag, 2008:201– 21.
106. Kahlenberg J. Michelle , M.D., Ph.D.a and David A. Fox M. *Advances in the Medical Treatment of Rheumatoid Arthritis.* NIH Public Access. 2011;27(1):11–20.
107. Wilder RL, Sternberg EM. Neuroendocrine hormonal factors in rheumatoid arthritis and related conditions. *Curr Opin Rheumatol [Internet].* 1990 Jun;2(3):436–40.

108. Ahmed SA, Hissong BD, Verthelyi D, Donner K, Becker K, Karpuzoglu-Sahin E. Gender and risk of autoimmune diseases: Possible role of estrogenic compounds. *Environ Health Perspect.* 1999;107(SUPPL. 5):681–6.
109. Wechalekar M, Lester S, Nagpal S, Cole S, Das A, Hissaria P et al. THU0070 RANKL, OPG and OSCAR but Not Dkk-1 Predict Radiographic Progression in An Inception Cohort of Seropositive Rheumatoid Arthritis (RA) Treated-To-Target with Combination Conventional DMARD Therapy. 2018.
110. Rossini M, Viapiana O, Adami S, Fracassi E, Idolazzi L, Dartizio C et al. In patients with rheumatoid arthritis, Dickkopf-1 serum levels are correlated with parathyroid hormone, bone erosions and bone mineral density. *Clin Exp Rheumatol.* 2015;33(1):77-83
111. Leech MT, Bartold PM. The association between rheumatoid arthritis and periodontitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2015;29(2):189–201.
112. Pischon N, Pischon T, Kröger J, Gülmez E, Kleber B-M, Bernimoulin J-P, et al. Association among rheumatoid arthritis, oral hygiene, and periodontitis. *J Periodontol.* 2008;79(6):979–86.
113. Äyräväinen L, Leirisalo-Repo M, Kuuliala A, Ahola K, Koivuniemi R, Meurman JH, et al. Periodontitis in early and chronic rheumatoid arthritis: a prospective follow-up study in Finnish population. *BMJ Open [Internet].* 2017;7(1):e011916.
114. Pons-Fuster A et al. Clinical evaluation of periodontal disease in patients with rheumatoid arthritis: A cross-sectional study. Quintessence Int. 2015;46:817-22
115. Scher J et al. Periodontal disease and the oral microbiota in newonset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2012;64:3083-3094
116. Napimoga M, Nametala C, Silva F et al. Involvement of the Wnt- β catenin signalling antagonists, sclerostin and dickkopf-related protein 1, in chronic periodontitis. *J Clin Periodontol;* 2014;41:550–7

117. Bello-Gualtero J, etal. Periodontal disease in subjects with genetic risk to develop arthritis and early rheumatoid arthritis: a cross sectional study. J periodontol 2016;87:346-456.

8. Anexos

FORMATO DE CRITERIOS DE EXCLUSION

Fecha: _____ Género: F M Edad: _____
 Nombre: _____ C.C: _____ Procedencia: _____

Paciente con proceso infeccioso en curso	SI__	NO__
Paciente con diagnóstico de otra enfermedad autoinmune.	SI__	NO__
Pacientes que rehúsen entrar al estudio y por tanto no firmen el consentimiento informado	SI__	NO__
Pacientes que rehúsen entrar al estudio o cuyos padres no autoricen el ingreso al mismo	SI__	NO__
Recibió tratamiento periodontal en los últimos seis meses	SI__	NO__
Consumió Antibióticos en los últimos 3 meses	SI__	NO__
Paciente en lactancia o embarazo	SI__	NO__
Paciente con ortodoncia	SI__	NO__
Paciente con cáncer	SI__	NO__
Paciente con Diabetes	SI__	NO__
Pacientes con número de dientes menor de 6	SI__	NO__
Paciente reconoce porque perdió sus dientes	SI__	NO__

ACEPTADO SI NO

NOMBRE EXAMINADOR

FIRMA

Observaciones: _____

DATOS EPIDEMIOLOGICOS COMPLEMENTARIOS:

1. **Tipo de Vivienda** Propia: _____ Arrendada: _____ Común: _____ Alojamiento: _____
2. **Estado Civil** Casado: _____ Soltero: _____ Viudo: _____ Unión libre: _____
3. **Nivel de estudios** Primaria: _____ Bachillerato: _____ Universitario: _____
4. **Actividad económica** Hogar: _____ Independiente: _____ Empleado dependiente: _____
 Pensionado: _____ Estudiante: _____
5. **Actividad física** SI: _____ NO: _____ Leve: _____ Moderada: _____ Excesiva: _____
6. **Talla:** _____ **Peso:** _____
7. **Paciente con exposición actual a cigarrillo. Cuantos diarios:** _____ SI__ NO__ 8.
- Paciente con exposición pasada a cigarrillo. Hace cuánto:** _____ SI__ NO__
9. **Paciente fumador pasivo. Hace cuánto:** _____ SI__ NO__