



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

VICERRECTORÍA EJECUTIVA

SISTEMA UNIVERSITARIO DE BIBLIOTECAS

Biblioteca Digital

La presente tesis es publicada a texto completo en virtud de que el autor ha dado su autorización por escrito para la incorporación del documento a la Biblioteca Digital y al Repositorio Institucional de la Universidad de Guadalajara, esto sin sufrir menoscabo sobre sus derechos como autor de la obra y los usos que posteriormente quiera darle a la misma.

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA**



**Asociación de los polimorfismos en *VDR* con la  
expresión de su mRNA, niveles séricos de calcidiol,  
calcitriol, sVDR y citocinas Th17/Treg en pacientes con  
artritis reumatoide**

**PRESENTA**

**M. EN C. MELISSA RIVERA ESCOTO**

Guadalajara, Jalisco, Enero 2024.

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA**



**TESIS DE GRADO DE DOCTORADO**

**PRESENTA**

M. EN C. MELISSA RIVERA ESCOTO

**DIRECTOR DE TESIS**

DR. EN C. ULISES DE LA CRUZ MOSSO

**CO-DIRECTORA**

DRA. EN C. EDITH OREGON ROMERO

Guadalajara, Jalisco, enero de 2024.

Este trabajo se realizó dentro de la Red de Inmunonutrición y Genómica Nutricional en las Enfermedades Autoinmunes del Centro Universitario de Ciencias de la Salud de la Universidad de Guadalajara.

**Bajo la Dirección de:**

Dr. en C. Ulises de la Cruz Mosso

**Codirección de:**

Dra. en C. Edith Oregon Romero

**Comité Tutorial:**

Dra. en C. Ma. Guadalupe Ramírez Dueñas

Dra. en C. Gloria Esther Martínez Monilla

Dra. en C. Margarita Montoya Buelna

Con el financiamiento de los fondos: “*UDG-PTC 1401 Apoyo a la Incorporación de NPTC SEP-PRODEP 2018*” para Ulises de la Cruz-Mosso, U.d.I.C.M., “*Programa de Apoyo a la Mejora en las Condiciones de Producción de los Miembros del SNI y SNCA 2019-2023*” (U.d.I.C.M.) y los “*Programas de Impulso a la Investigación (PIN) 2020 y 2022*” de la Universidad de Guadalajara (U.d.I.C.M.). La alumna Melissa Rivera Escoto durante el periodo del programa de posgrado contó con beca CONAHCYT (No. 725153).

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	4
II.1. Artritis reumatoide (AR)	4
II.2 Epidemiología	4
II.3. Criterios de clasificación del ACR	5
II.3.1. Índice de actividad clínica de la enfermedad: DAS28	5
II.4 Fisiopatología	6
II.5 Patogénesis AR	7
II.6 Factores genéticos en el desarrollo de AR	9
II.7. Factores ambientales que contribuyen en el desarrollo de la AR	10
II.7. Estado nutricional, alimentación y AR	11
II.7.1 Composición corporal, consumo dietético y deficiencias nutricionales en AR	11
II.8 Vitamina D en autoinmunidad	15
II.8.1. Vitamina D, fuentes y metabolismo	15
II.8.2. Funciones de la vitamina D	17
II.8.3. Vitamina D y sistema inmune	18
II.8.4. Estudios de asociación del consumo de vitamina D y autoinmunidad	19
II.8.5. Deficiencias séricas de vitamina D en pacientes con AR	20
II.9. Receptor de vitamina D y polimorfismos	21
II.9.1. Receptor de vitamina D	21
II.9.2. Gen del receptor de vitamina D	24
II.9.3. Polimorfismos en el VDR	26
II.10 Niveles séricos de VDR soluble (sVDR)	28
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
IV. HIPÓTESIS	31
V. OBJETIVOS	32
V.1. Objetivo general	32
V.2. Objetivos particulares	32
VI. DISEÑO METODOLÓGICO	33
VI.1. Tipo de estudio	33
VI.2. Sede del estudio	33
VI.3. Consideraciones éticas	33
VI.4. Consideraciones de bioseguridad	33

VI.5. Universo de estudio _____	33
VI.6. Periodo de estudio _____	33
VI.7.1. Criterios de inclusión _____	34
VI.7.2. Criterios de no inclusión _____	34
VI.7.3 Criterios de exclusión _____	34
VI.8 Cálculo del tamaño de muestra _____	35
VI.9 Variables _____	35
VI.9.1 Variables independientes _____	35
VI.9.2 Variables dependientes _____	35
VI.11 Métodos _____	36
VI.11.1 Valoración clínica _____	36
VI.11.1.1 Inclusión de participantes _____	36
VI.11. 2 Toma de muestras sanguíneas _____	36
VI.11.2.1 Cuantificación de los niveles séricos de calcidiol [25-(OH) D3] y calcitriol [1,25-(OH)2 D3] _____	37
VI.11.3 Cuantificación de los niveles séricos de sVDR _____	38
VI.11.4 Determinación de los polimorfismos <i>FokI</i> , <i>BsmI</i> , <i>Apal</i> y <i>TaqI</i> en <i>VDR</i> . _____	39
VI.11.5 Estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en <i>VDR</i> _____	40
VI.11.6 Cuantificación expresión mRNA de <i>VDR</i> _____	42
VI.11.7 Cuantificación de la expresión del mRNA de <i>VDR</i> , <i>FOXP3</i> y <i>RORc</i> en leucocitos totales _____	43
VI.11.8 Cuantificación de citocinas Th17 y Treg _____	46
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO _____	47
VIII. DIAGRAMA DE TRABAJO _____	48
IX. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES _____	49
X. RESULTADOS _____	50
XII. DISCUSIÓN _____	96
XIII. CONCLUSIÓN GENERAL _____	108
XIV. PERSPECTIVAS _____	109
XV. PRODUCTOS OBTENIDOS _____	110
XVI. RESULTADOS COMPLEMENTARIOS _____	112
XV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	128

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. ACR/EULAR 2010. Criterios de clasificación para la AR	5
Cuadro 2. Índice de actividad clínica de la enfermedad (DAS 28)	6
Cuadro 3. Consumo dietético y efectos en respuesta inflamatoria por AR	15
Cuadro 4. Vitamina D y asociación con enfermedades autoinmunes.	20
Cuadro 5. Deficiencias séricas de vitamina D y su asociación con AR	21
Cuadro 6. Características moleculares de los polimorfismos FokI, BsmI, Apal y TaqI en VDR.	26
Cuadro 7. Estudios de asociación en AR con los polimorfismos en VDR.	27
Cuadro 8. Especificaciones de los kits de ensayo ELISA para calcidiol y calcitriol	37
Cuadro 9. Valores de referencia para calcidiol y calcitriol	37
Cuadro 10. Especificaciones del kit de ELISA para sVDR	38
Cuadro 11. Características de los polimorfismos en VDR	41
Cuadro 12. Características sociodemográficas y antropométricas de ambos pacientes con AR y SC.	50
Cuadro 13. Características clínicas de los pacientes con AR y SC.	51
Cuadro 14. Variables antropométricas, bioquímicas y clínicas estratificadas de acuerdo con la actividad de la enfermedad (DAS 28) en pacientes con AR.	60
Cuadro 15. Variables antropométricas y niveles séricos de variables bioquímicas y metabolitos de la vitamina D estratificados por terciles de sVDR en sujetos control (SC).	64
Cuadro 16. Variables antropométricas, bioquímicas, metabolitos de la vitamina D y variables clínicas de las pacientes con artritis reumatoide (AR) estratificadas por terciles de sVDR	65
Cuadro 17. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo FokI en el gen VDR en pacientes con AR y SC.	68
Cuadro 18. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo BsmI en el gen VDR en pacientes con AR y SC	70
Cuadro 19. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo Apal en el gen VDR en pacientes con AR y SC	71
Cuadro 20. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo TaqI en el gen VDR en pacientes con AR y SC.	73
Cuadro 21. Frecuencias haplotípicas inferidas de los polimorfismos BsmI, Apal y TaqI en VDR en ambos grupos de estudio.	75
Cuadro 22. Frecuencias haplogenotípicas de los polimorfismos BsmI, Apal y TaqI de VDR en ambos grupos de estudio	76
Cuadro 23. Niveles séricos de calcidiol estratificados de acuerdo con los haplogenotipos de los polimorfismos de BsmI, Apal y TaqI en el gen VDR.	79

Cuadro 24. Niveles séricos de calcitriol estratificados de acuerdo con los haplogenotipos de los polimorfismos de BsmI, Apal y TaqI en el gen VDR.	80
Cuadro 25. Niveles séricos de sVDR estratificados de acuerdo con los haplogenotipos de acuerdo con los haplogenotipos de los polimorfismos de BsmI, Apal y TaqI en el gen VDR.	81
Cuadro 26. Puntaje DAS 28 de las pacientes con AR estratificado de acuerdo con los haplogenotipos de los polimorfismos BsmI, Apal y TaqI en el gen VDR.	83
Cuadro 27. Niveles séricos de IL-10 e IL-17 en pacientes con AR categorizados por haplogenotipos de los polimorfismos BsmI, Apal y TaqI.	95

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases de desarrollo AR	8
Figura 2. Daño articular y sistema inmune en AR	9
Figura 3. Síntesis y metabolismo de vitamina D.	16
Figura 4. Calcitriol (1,25 (OH)D <sub>3</sub> y sistema inmune.	19
Figura 5. Estructura del receptor de vitamina D (VDR).	23
Figura 6. Interacción genómica entre el calcitriol y el receptor de vitamina D.	24
Figura 7. Representación esquemática VDR y sus isoformas.	25
Figura 8. Fundamento ensayo discriminación alélica por sondas TaqMan®.	40
Figura 9. Separación por gradientes de linfocitos totales.	43
Figura 10. Fundamento cuantificación expresión mRNA con técnica de sondas TaqMan®.	45
Figura 11. Fundamento de la técnica ELISA indirecta tipo sandwich.	46
Figura 12. Comparación de los niveles séricos de calcidiol y calcitriol en pacientes con AR y SC.	52
Figura 13. Comparación de los niveles séricos de calcidiol estratificados por calcidiol categorizado en pacientes con AR y SC.	53
Figura 14. Niveles séricos de calcitriol estratificados por calcidiol categorizado en pacientes con AR y SC.	54
Figura 15. Análisis de la relación calcitriol/calcidiol en pacientes con AR y SC.	54
Figura 16. Análisis de la relación calcitriol/calcidiol estratificada por calcidiol categorizado en pacientes con AR y SC.	55
Figura 17. Correlación de los niveles séricos de calcidiol con la relación calcitriol/calcidiol en pacientes con artritis reumatoide (AR) y sujetos control (SC).	56
Figura 18. Asociación de la Artritis Reumatoide (AR) con los metabolitos de la vitamina D.	57
Figura 19. Efecto de la artritis reumatoide (AR) sobre el ratio calcitriol/calcidiol (pg/ng).	57

<i>Figura 20. Comparación de los niveles solubles del sVDR en pacientes con AR vs. SC y capacidad discriminatoria (curva ROC) de sVDR entre pacientes AR y SC.</i>	58
<i>Figura 21. Correlograma de los metabolitos de la vitamina D (sVDR, ratio calcitriol/calcediol y calcitriol) con variables antropométricas, bioquímicas y pCr en pacientes con artritis reumatoide (AR).</i>	59
<i>Figura 22. Niveles de sVDR estratificados por actividad de la enfermedad (DAS28) y capacidad discriminatoria de sVDR entre pacientes AR con actividad y remisión de la enfermedad..</i>	61
<i>Figura 23. Análisis de correlación entre la actividad clínica de la enfermedad (DAS 28) y sVDR en pacientes con artritis reumatoide (AR).</i>	62
<i>Figura 24. Niveles séricos de calcediol y calcitriol estratificados por actividad clínica de la enfermedad en pacientes con AR.</i>	62
<i>Figura 25. Relación calcitriol/calcediol categorizada por actividad clínica de la enfermedad (DAS28) en pacientes con artritis reumatoide (AR)</i>	63
<i>Figura 26. Correlaciones entre pCr con sVDR en pacientes con AR y SC.</i>	66
<i>Figura 27. Diamante de desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos FokI, BsmI, Apal y TaqI ubicados en el gen de VDR.</i>	74
<i>Figura 28. Niveles séricos de calcediol (ng/mL), calcitriol (pg/mL) y relación calcitriol/calcediol (pg/mL/ng/mL) categorizados por los genotipos del polimorfismo TaqI VDR en pacientes con artritis reumatoide (AR) y sujetos control (SC)</i>	78
<i>Figura 29. Niveles de sVDR estratificados por genotipo del polimorfismo TaqI VDR en pacientes con AR y SC.</i>	79
<i>Figura 30. Puntaje DAS 28 de las pacientes con AR estratificado por genotipos del polimorfismo TaqI VDR.</i>	82
<i>Figura 31. Expresión mRNA VDR, FOXP3 y RORC en pacientes con AR vs. SC.</i>	84
<i>Figura 32. Análisis de expresión mRNA VDR en pacientes AR y SC por genotipo del polimorfismo FokI.</i>	84
<i>Figura 33. Análisis de expresión mRNA VDR en pacientes AR y SC.</i>	85
<i>Figura 34. Análisis de la expresión mRNA RORC pacientes AR y SC.</i>	87
<i>Figura 35. Análisis de la expresión mRNA FOXP3 en pacientes AR y SC.</i>	89
<i>Figura 36. Análisis de la expresión mRNA VDR, FOXP3 y RORc en pacientes con AR.</i>	90
<i>Figura 37. Niveles séricos de IL-10 e IL-17 estratificados por calcediol categorizado en pacientes con AR.</i>	91
<i>Figura 38. Niveles séricos de IL-10 e IL-17 estratificados por terciles de calcitriol en pacientes con AR.</i>	92
<i>Figura 39. Niveles séricos de IL-10 e IL-17 estratificados por actividad clínica (DAS 28).</i>	92
<i>Figura 40. Niveles séricos de IL-10 e IL-17 categorizadas por las distintas combinaciones de tratamiento farmacológico en las pacientes con AR.</i>	93
<i>Figura 41. Niveles séricos de IL-10 e IL-17 estratificados por los genotipos del polimorfismo TaqI.</i>	94

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACPAS:** Anticuerpos antipéptidos citrulinados
- ACR:** Colegio Americano de Reumatología del inglés *American College of Rheumatology*
- ADN:** Acido desoxirribonucleico
- AR:** Artritis reumatoide
- DAS28:** índice de actividad clínica del inglés *Disease Activity score*
- DL:** Desequilibrio de ligamiento
- DNAg:** Ácido desoxirribonucleico genómico
- EULAR:** Liga Europea contra las enfermedades reumáticas del inglés *European League against Rheumatism*
- FR:** Factor Reumatoide
- GAPDH:** Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
- HDL:** Lipoproteína de alta densidad del inglés *High density lipoprotein*
- ICC:** Índice cintura-cadera
- IMC:** Índice de masa corporal
- LDL:** Lipoproteína de baja densidad del inglés *Low density lipoprotein*
- ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa del inglés *Polimerase chain reaction*
- pCr:** Proteína C reactiva
- RXR:** Receptor X de retinoides
- sVDR:** Receptor de vitamina D soluble del inglés *soluble vitamin D receptor*
- VDR:** Receptor de vitamina D del inglés *vitamin D receptor*
- VDRE:** Elementos de respuesta a vitamina D del inglés *Vitamin D response elements*

## RESUMEN

Variantes genéticas en el receptor de la vitamina D (VDR) podrían estar asociadas con susceptibilidad genética para la artritis reumatoide (AR), con niveles menores de vitamina D y con actividad clínica mayor de la enfermedad. **Objetivo:** Determinar la asociación de los polimorfismos en *VDR* con la expresión de su ARNm, los niveles séricos de calcidiol, calcitriol, sVDR y las citocinas Th17/Treg en pacientes con AR. **Metodología:** Estudio transversal en mujeres: 152 pacientes con AR y 201 sujetos control (SC). Los metabolitos de la vitamina D se cuantificaron con ELISA, la genotipificación de los polimorfismos con ensayos de discriminación alélica TaqMan® y la expresión del mRNA de *VDR*, *RORC* y *FOXP3* se cuantificó por qPCR con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . La actividad clínica de la enfermedad se evaluó de acuerdo con el índice DAS28-pCr. **Resultados:** Las pacientes con AR deficientes de calcidiol presentaron una hidroxilación (AR:3.16 vs. SC: 2.01;  $p<0.001$ ) y niveles séricos de calcitriol (AR: 48.09 vs. SC: 32.48;  $p<0.001$ ) mayores que las SC. Los niveles de calcitriol correlacionaron positivamente con la pCr ( $r=0.23$ ,  $p=0.01$ ) y con sVDR ( $r=0.21$ ,  $p=0.03$ ). Los genotipos CC (OR= 3;  $p=0.01$ ) y CT (OR= 2;  $p<0.01$ ) y el alelo C del polimorfismo *TaqI VDR* (OR= 1.7;  $p=0.001$ ) se asociaron con riesgo genético para la enfermedad. También, los haplotipos ACC (OR: 1.52;  $p=0.03$ ), GAT (OR: 1.57;  $p=0.02$ ) y GCC (OR: 5.56;  $p<0.001$ ), así como los haplogenotipos en *VDR* GAT/GCT (OR: 2.23;  $p=0.02$ ) y AAC/GAT (OR: 3.2;  $p<0.01$ ) se asociaron con susceptibilidad genética para AR. Además, las pacientes con AR portadoras de los genotipos CT de *TaqI VDR* (AR: 1.77 vs. SC: 1.34 pg/ng;  $p<0.01$ ) presentaron una tasa de hidroxilación mayor que las SC. Las pacientes AR portadoras de los genotipos CT y CC del polimorfismo *TaqI* en *VDR* expresaron menos mRNA *VDR*. **Conclusiones:** Las pacientes con AR deficientes de vitamina D presentaron hidroxilación y niveles de calcitriol mayores que correlacionaron positivamente con la pCr y sVDR. Además, las pacientes con niveles elevados de calcitriol presentaron una expresión mayor de *FOXP3*, *RORc* y concentraciones altas de IL-10 e IL-17. Así también, la presencia del alelo C del polimorfismo *TaqI* en *VDR* se asoció con susceptibilidad mayor para la enfermedad.

## ABSTRACT

Genetic variations in the vitamin D receptor (VDR) have been described as associated with genetic susceptibility to rheumatoid arthritis (RA), lower levels of vitamin D, and higher clinical disease activity. **Aim:** To determine the association of VDR polymorphisms with the expression of its mRNA, serum levels of calcidiol, calcitriol, sVDR and Th17/Treg cytokines in RA patients. **Methodology:** A cross-sectional study was performed in 152 RA patients and 201 control subjects (CS). Vitamin D metabolites were measured by ELISA. Allelic discrimination with TaqMan® for VDR polymorphisms genotyping. VDR mRNA expression were quantified by RT-qPCR and analyzed with  $2^{-\Delta\Delta}$  Ct method. Clinical disease activity according to DAS28-CRP. **Results:** RA patients deficient in calcidiol showed hydroxylation (RA: 3.16 vs. SC: 2.01;  $p < 0.001$ ) and calcitriol serum levels higher (RA: 48.09 vs. SC: 32.48;  $p < 0.001$ ) than CS. Elevated levels of calcitriol correlated positively with CRP ( $r=0.23$ ,  $p=0.01$ ) and with sVDR ( $r=0.21$ ,  $p=0.03$ ). The CC (OR: 3;  $p=0.01$ ) and CT (OR: 2;  $p < 0.01$ ) genotypes, and the C allele of the *TaqI* VDR polymorphism (OR: 1.7;  $p=0.001$ ), were associated with genetic risk for the disease. Additionally, the ACC (OR: 1.52;  $p=0.03$ ), GAT (OR: 1.57;  $p=0.02$ ), and GCC (OR: 5.56;  $p < 0.001$ ) haplotypes, as well as the GAT/GCT (OR: 2.23;  $p=0.02$ ) and AAC/GAT (OR: 3.2;  $p < 0.01$ ) haplogenotypes of VDR polymorphisms were also associated with genetic susceptibility to RA. Furthermore, RA patients with the CT genotypes of the *TaqI* VDR (RA: 1.77 vs. SC: 1.34 pg/ng;  $p < 0.01$ ) exhibited a higher hydroxylation rate than the CS. RA patients with the CT and CC genotypes of the *TaqI* VDR expressed less VDR mRNA. **Conclusions:** RA patients deficient in vitamin D exhibited higher hydroxylation and calcitriol levels that positively correlated with pCr and sVDR. Additionally, patients with elevated calcitriol levels showed increased expression of *FOXP3*, *RORc*, and high concentrations of IL-10 and IL-17. Furthermore, the presence of the C allele of the *TaqI* polymorphism in VDR was associated with a higher susceptibility to the disease.

## I. INTRODUCCIÓN

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica inflamatoria de etiología multifactorial. Factores genéticos y ambientales se han asociado al desarrollo de la patología. Dentro de los ambientales, alteraciones en las concentraciones de los metabolitos de la vitamina D (calcidiol y calcitriol), específicamente la deficiencia, se han asociado con el desarrollo, progresión y con actividad clínica mayor de la enfermedad.

El receptor de vitamina D (VDR) se expresa en células del sistema inmune donde al interactuar con su ligando el calcitriol actúa como un factor de transcripción y regula la expresión de genes asociados con la respuesta inmune y con la homeostasis de los niveles de calcidiol y calcitriol.

La deficiencia de vitamina D en la AR se ha asociado con polimorfismos en *VDR*, y su expresión en células del sistema inmune podría estar relacionada con el desarrollo de autoinmunidad. Los polimorfismos más estudiados en *VDR*, son *FokI*, *BsmI*, *Apal* y *TaqI*. Estos se han asociado con alteraciones en las concentraciones de los metabolitos de la vitamina D, con susceptibilidad a la enfermedad y con cambios en la homeostasis inmunológica de las células Th17/Treg y sus citocinas, que podrían verse reflejados en una actividad clínica mayor de la AR.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. Artritis reumatoide (AR)

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica, inflamatoria, autoinmune de etiología multifactorial y de manifestación clínica heterogénea. Afecta principalmente a las articulaciones diartroideas al generar discapacidad progresiva, la cual afecta negativamente la calidad de vida del paciente con AR. (Smolen, Daniel. Aletaha, *et al.*, 2018).

La presencia de anticuerpos a inmunoglobulina G (IgG; considerado como el factor reumatoide; FR) y proteínas citrulinadas ACPA (del inglés, *anti-citrulinated protein antibodies*) son característicos del cuadro de la respuesta inmune en esta enfermedad (Smolen, Daniel. Aletaha, *et al.*, 2018).

### II.2 Epidemiología

La prevalencia mundial de la AR oscila entre 0.3 y 1%, los países asiáticos presentan las tasas más bajas de prevalencia de la enfermedad. En los países americanos se ha descrito una prevalencia entre el 5 – 6% de AR; sin embargo, no se tienen datos de la mayor parte de países a nivel mundial. En México la prevalencia nacional es del 1.49%, Yucatán es el estado con mayor prevalencia de AR con 2.66%, con estos datos se puede resaltar que el desarrollo y frecuencia de la patología podría estar influenciado por el componente genético (Peláez-Ballestas *et al.*, 2011; Moreno-Montoya *et al.*, 2015).

Se estima que posterior a 10 años del curso de la enfermedad la mitad de las personas que padecen AR no podrán mantener un empleo de tiempo completo, debido a la discapacidad generada por el curso de la patología. (Silman and Pearson, 2002; World Health Organization, 2013).

En México, el 1.6% de la población tiene diagnóstico para AR, aproximadamente 1 millón de personas la padecen, siendo en el sexo femenino el de mayor prevalencia de la enfermedad. (Jaillier, Arango and Pérez, 2015).

### II.3. Criterios de clasificación del ACR

Los criterios de clasificación para la AR fueron emitidos por el Colegio Americano de Reumatología (ACR del inglés, *American College of Rheumatology*) y la Liga Europea Contra el Reumatismo 2010 para AR (EULAR del inglés, *European League Against College of Rheumatology*), se crearon con el objetivo de mejorar la clasificación y diagnóstico de la AR de evolución temprana (Cuadro1) (Aletaha *et al.*, 2010a; Gómez, 2011).

#### Cuadro 1. ACR/EULAR 2010. Criterios de clasificación para la AR

Población objetivo: Pacientes 1) quienes tengan al menos una articulación con definición clínica de sinovitis (inflamación) 2) con sinovitis no explicada por otra enfermedad.

Variable	Puntaje
<b>Afectación articular</b>	
1 articulación grande afectada	0
2-10 articulaciones grandes afectadas (con o sin participación de articulaciones grandes)	1
1-3 articulaciones pequeñas afectadas (con o sin participación de articulaciones grandes)	2
4-10 articulaciones pequeñas afectadas (con o sin participación de articulaciones grandes)	3
>10 articulaciones afectadas (al menos 1 articulación pequeña)	5
<b>Serología</b>	
FR y ACPA negativos	0
FR o ACPA positivos bajos	2
FR o ACPA positivos altos	5
<b>Reactantes de fase aguda</b>	
pCr y VSG normal	0
pCr o VSG elevado	1
<b>Duración de síntomas</b>	
<6 semanas	0
≥ 6 semanas	1

Un marcador  $\geq 6/10$  es necesario para clasificar a pacientes que tienen AR. FR: factor reumatoide, ACPA: anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados, VSG: velocidad de sedimentación globular, pCr: proteína C reactiva (modificado de (Aletaha *et al.*, 2010a; Gómez, 2011).

#### II.3.1. Índice de actividad clínica de la enfermedad: DAS28

El índice de actividad clínica DAS28 (del inglés *Disease Activity Score 28*) tiene como objetivo estimar la actividad y evolución de la enfermedad en pacientes con AR. Se basa en la evaluación de veintiocho articulaciones diartroideas sensibles e

inflamadas: hombros, codos, muñecas, articulaciones metacarpofalángicas, articulaciones interfalángicas proximales y las rodillas.(Cuadro 2) (Aletaha *et al.*, 2010a; Gómez, 2011).

**Cuadro 2. Índice de actividad clínica de la enfermedad (DAS 28)**

<b>Actividad clínica de la enfermedad</b>	<b>Puntaje</b>
<i>Remisión</i>	<2.6
<i>Actividad leve</i>	≥2.6 <3.2
<i>Actividad moderada</i>	≥3.2 <5.1
<i>Actividad severa</i>	≥5.1

Modificado de (Aletaha *et al.*, 2010b).

## II.4 Fisiopatología

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad generalmente se expresan años después de su patogénesis. El desarrollo de la enfermedad está relacionado principalmente con factores de predisposición genética los cuales interaccionan con factores ambientales que pueden contribuir a detonar el desarrollo y la modulación de la severidad de la evolución de la enfermedad (Smolen, Daniel. Aletaha, *et al.*, 2018). Dichos factores genéticos y ambientales desencadenan una respuesta inflamatoria que resulta en la destrucción de la sinovia, esto sucede como causa de distintas modificaciones post-transduccionales a las que se someten proteínas intracelulares como las histonas y de la matriz extracelular como la fibronectina, colageno, enolasa, vimentina y fibrinógeno, así como la modificación del aminoácido arginina a citrulina, este proceso de citrulinación desencadena la generación de un neopéptido y la posterior respuesta inmune caracterizada por la producción de ACPAs. (McInnes and Schett, 2011; Smolen, Daniel. Aletaha, *et al.*, 2018)

Posterior a la citrulinación, los péptidos alterados se unen al complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés *Major Histocompatibility Complex*) especialmente a aquellos que contienen el epítipo compartido, lo que conduce a la presentación del antígeno a los linfocitos T cooperadores (Th, del inglés *lymphocytes T helper*) que a su vez estimulan a los linfocitos B a sintetizar anticuerpos que reconocen proteínas propias (FR (IgG) y ACPAS) como no propias lo que genera una respuesta autoinmune mediada por autoanticuerpos dirigida

contra antígenos propios modificados (McInnes and Schett, 2011; Smolen, Daniel. Aletaha, *et al.*, 2018).

## II.5 Patogénesis AR

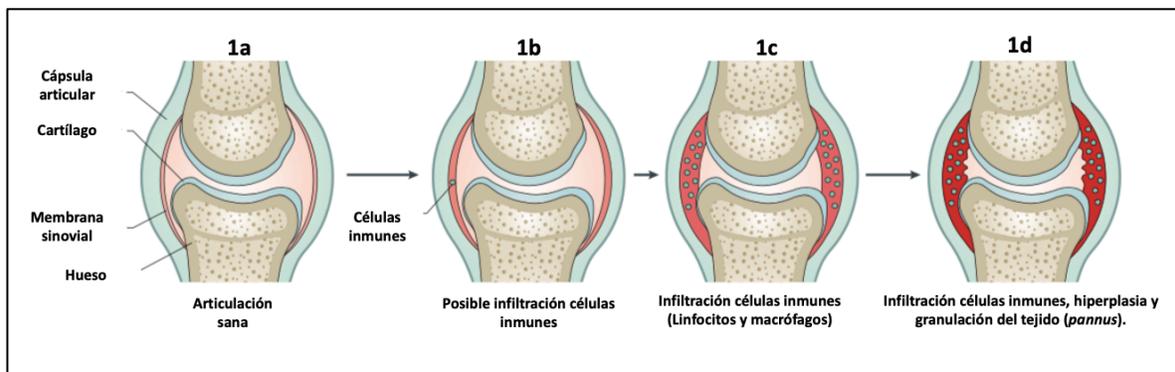
El tejido sinovial es el tejido mayormente afectado por la AR. La sinovia sana se caracteriza por ser una estructura cubierta por un fino revestimiento compuesto por macrófagos tipo sinoviocitos (MLS, del inglés *Macrophages-Like Synoviocyts*), fibroblastos tipo sinoviocitos (FLS, del inglés *Fibroblasts-Like Synoviocyts*), fibroblastos y distintas células inmunes como linfocitos T y B (McInnes and Schett, 2011; Smolen, Daniel. Aletaha, *et al.*, 2018) (Figura 1a).

Se distinguen 3 fases en el desarrollo de la inflamación de la enfermedad (Figura 1):

**Fase 1:** Inflamación sinovial y perisinovial que se caracteriza por la presencia de edema en el estroma sinovial, proliferación de células sinoviales (sinoviocitos), infiltración de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y macrófagos, los cuales promueven la producción de citocinas inflamatorias como IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$  del inglés *Tumor Necrosis Factor-alpha*), la expresión de proteasas como las metaloproteinasas de matriz (MMPs del inglés *Matrix Metallo-Peptidases*) y moléculas mediadoras de la inflamación como prostaglandinas y leucotrienos (Smolen, Daniel. Aletaha, *et al.*, 2018) (Figura 1b).

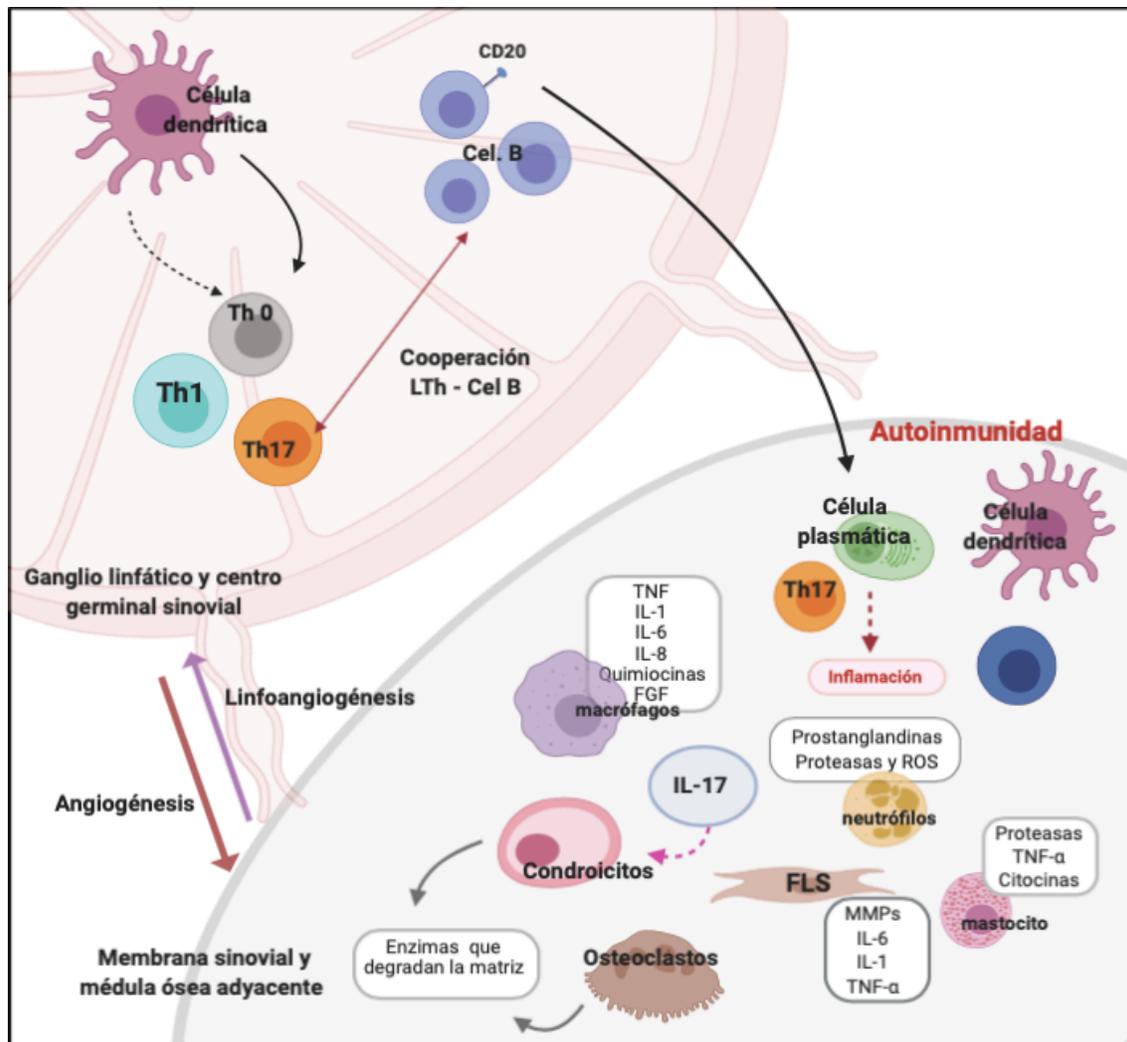
**Fase 2:** Persistencia de la inflamación, desarrollo y vascularización de tejido granular abundante (*pannus*) sobre la articulación lo cual genera daño al cartílago y tejidos adyacentes (cápsula, tendones, ligamentos y hueso), provoca la destrucción por la acción de proteasas liberadas por las células polimorfonucleares y macrófagos. Así también esta etapa se caracteriza por la infiltración de células B que proliferan y producen anticuerpos contra proteínas propias como FR y ACPAs que generan una respuesta inmune contra lo propio (Smolen, Daniel. Aletaha, *et al.*, 2018) (Figura 1c).

**Fase 3:** Fibrosis del tejido que conlleva a la deformación e inmovilidad articular. El tejido granular producido en la segunda fase se convierte en tejido fibroso que deforma a la articulación. Aunque los mecanismos de daño son distintos en pacientes ACPAs positivos y ACPAs negativos, en ambos casos el componente inmune es el protagonista del daño articular. El daño articular y la erosión del hueso se deben principalmente a la activación de los osteoclastos (células que degradan, reabsorben y remodelan los huesos) por el ligando receptor de factor nuclear- $\kappa\beta$  (RANKL, del inglés *Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa\beta$  Ligand*), el cuál es producido por linfocitos T, esto en conjunto con la presencia de citocinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-1 y TNF- $\alpha$ ) generadas por macrófagos y FLS presentes en el revestimiento sinovial incrementan el daño al tejido (McInnes and Schett, 2011; Smolen, Daniel. Aletaha, *et al.*, 2018) (Figura 1d y 2).



**Figura 1. Fases de desarrollo AR**

(Imagen modificada de Smolen *et al.*, 2018)



**Figura 2. Daño articular y sistema inmune en AR**

(Imagen modificada de Mc Innes, I., *et al.*, 2007). En la imagen se observa el mecanismo de patogénesis de la AR en la cápsula sinovial. La infiltración de linfocitos T en conjunto con la presencia de MLS y FLS favorecen la producción de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ ) y la expresión de enzimas metaloproteínasas (MMPs), fenómeno que de manera sostenida genera la remodelación del tejido articular, de manera paralela la formación de centros germinales por la infiltración de linfocitos B co-estimulados por la presencia de linfocitos T favorecen la producción de auto-anticuerpos anti-IgG (FR, Factor Reumatoide) y anticuerpos anti-péptidos citrulinados (ACPAs).

## II.6 Factores genéticos en el desarrollo de AR

El desarrollo de AR está ligado fuertemente al componente genético con un porcentaje de heredabilidad del 60%. Los *loci* específicos del MHC II es la región específica de mayor susceptibilidad genética. Algunos alelos del *locus* relacionado

con el antígeno HLA (DR), como *HLA-DRB1\*01* y *HLA-DRB1\*04* que codifican para el epítipo compartido están significativamente relacionados con el riesgo de desarrollar AR. (Smolen, Daniel. Aletaha, *et al.*, 2018).

Se han identificado otros genes de menor riesgo (*PTNP22*, *BLK*, *ANKRD55*, *IL6ST*, *AFF3*, *CD28*, *TNFAIP3*, *PRL*, *NFIA* y *VDR*) asociados con vías de señalización, estimulación, activación de la inflamación y diferenciación de células del sistema inmune, aunque varios alelos se correlacionan débilmente, es probable que la interacción con otros genes y factores ambientales tengan un efecto acumulativo epistático que favorece la aparición o aceleran la evolución de la enfermedad. (McInnes and Schett, 2011; Smolen, Daniel. Aletaha, *et al.*, 2018)

## **II.7. Factores ambientales que contribuyen en el desarrollo de la AR**

Dentro de los factores ambientales relacionados con la AR se han descrito al tabaquismo, fumar duplica el riesgo de padecer AR y se ha relacionado con concentraciones séricas mayores de citocinas proinflamatorias, mayor actividad de la enfermedad e incremento en la frecuencia de ACPA positivos en pacientes con AR (Källberg *et al.*, 2011; Vesperini *et al.*, 2013).

La exposición al polvo de sílice, asbesto, cemento pulverizado, fibras de vidrio, polvo textil y otros materiales también se han relacionado con el desarrollo de AR (Stolt *et al.*, 2005; Too *et al.*, 2016).

Aún no se comprende del todo, como es que los factores ambientales contribuyen al desarrollo de AR. sin embargo, se reporta que los factores estresantes previamente mencionados pueden actuar sobre las células del estroma sinovial y conducir a modificaciones postraduccionales del aminoácido arginina (Arg) a citrulina en proteínas intracelulares (histonas) y de la matriz extracelular (fibronectina, colágeno, fibrinógeno, enolasa y vimentina) por medio de la inducción de peptidil arginina deiminasa, proceso conocido como citrulinación (Smolen, Daniel. Aletaha, *et al.*, 2018).

Otros factores como la composición en diversidad y abundancia de la microbiota oral e intestinal también están implicados en procesos de inflamación crónica y autoinmunidad en pacientes con AR, por ejemplo, se ha reportado que la

enfermedad periodontal tiene similitudes clínicas de acuerdo a la presencia de inflamación crónica y las erosiones óseas, se ha hipotetizado que la relación esta mediada por la presencia de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en la microbiota oral. Por otra parte se ha reportado disminución en la variedad y abundancia en la microbiota intestinal de pacientes con AR en comparación con la población general (Chen *et al.*, 2016; Konig *et al.*, 2016).

## **II.7. Estado nutricional, alimentación y AR**

### **II.7.1 Composición corporal, consumo dietético y deficiencias nutricionales en AR**

Se ha demostrado que una composición corporal alterada caracterizada por una mayor cantidad de masa grasa aumenta la probabilidad de padecer enfermedades crónicas degenerativas, metabólicas, cardiovasculares, neoplásicas y con alteraciones en la modulación de procesos inflamatorios crónicos y agudos (Izaola *et al.*, 2015; Alvarez-Nemegyei *et al.*, 2018). De igual manera se ha asociado un mayor índice de masa corporal (IMC >25 kg/m<sup>2</sup>) con mayor actividad clínica de las enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (LES) en nuestra población (Meza-Meza *et al.*, 2019). En otros estudios también se ha reportado que debido a la inactividad física en pacientes con AR estos pueden presentar “caquexia reumatoide” que se refiere a la acumulación de grasa y la depleción de masa muscular (sarcopenia) debido a cambios catabólicos y la incapacidad para realizar actividad física (Kerekes *et al.*, 2014; Masuko, 2014).

En estados de obesidad los adipocitos secretan moléculas solubles proinflamatorias (adipocinas) como leptina y resistina las cuales están involucradas en el desarrollo y proliferación de células inmunes fagocíticas y “*natural killer*” (NK). Además, los adipocitos también producen otras citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IL-1. Debido a que la presencia de TNF- $\alpha$  e IL-1 están directamente relacionados con la inflamación crónica y la hiperplasia sinovial en la etiopatogenia de AR, el estado pro inflamatorio dado por la presencia de obesidad podría contribuir a la severidad de la patología (Mancuso, 2016; Alvarez-Nemegyei *et al.*, 2018).

En relación al consumo de nutrientes mantener una dieta adecuada y equilibrada puede prevenir y/o retardar la aparición de AR e incluso contribuir a la mejoría clínica de los pacientes, al disminuir el estado pro inflamatorio (Masuko, 2018; Bustamante *et al.*, 2020). El tipo de alimentos que se consume pueden asociarse directamente con el desarrollo o disminución de la inflamación y modificaciones metabólicas, el aumento en los niveles de antioxidantes séricos e incluso mantener una composición balanceada de la microbiota intestinal son factores que pueden modificarse con la dieta, lo cuales se han reportado que contribuyen en la modulación de síntomas en pacientes con AR (Masuko, 2018; Rambod, Nazarinia and Raieskarimian, 2018; Sparks *et al.*, 2019; Bustamante *et al.*, 2020).

Algunos estudios reportan que el consumo de alimentos como pescado, aves, lácteos desgrasados, frijoles e incluso el consumo moderado de alcohol han tenido efectos preventivos sobre el desarrollo de enfermedades autoinmunes como AR, mientras que un consumo elevado de bebidas azucaradas y carnes rojas han mostrado una correlación positiva con el desarrollo de la misma (Giuseppe *et al.*, 2014; Hu, Karen H. Costenbader, *et al.*, 2014). Además, un consumo elevado de vegetales y mariscos como los pescados azules o de agua fría (salmón rosado, atún) se ha correlacionado negativamente con el puntaje del índice de actividad clínica en AR (DAS28-VSG) y con la expresión de MMP-3 (enzimas metaloproteinasas, las cuales se encargan de remodelar la matriz extracelular) en pacientes con AR (Murakami *et al.*, 2020).

Sin embargo, se ha descrito que se requiere de más estudios para establecer correlaciones directas nutrimento-inflamación para determinar la relación adecuada y sugerir planes de alimentación preventivos y de profilaxis en AR. (Benito-Garcia *et al.*, 2007; Giuseppe *et al.*, 2014; Hu, Karen H Costenbader, *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2017).

Aunque el uso de medicamentos logren mediar los procesos inflamatorios propios de la enfermedad, es crucial considerar una intervención nutricional adecuada en personas con AR, debido a las limitaciones físicas propias de la AR, estas personas suelen tener ingestas nutricionales en los extremos de insuficientes

energéticamente y/o deficientes nutricionalmente o con un superávit calórico (Berube *et al.*, 2017; Mizukami *et al.*, 2017).

Así también se ha descrito evidencia de la relación del consumo de algunos nutrimentos con la respuesta inflamatoria en AR en distintos modelos experimentales (Cuadro 3).

Se ha reportado que las personas con AR tienen dietas deficientes en calidad y cantidad en comparación con personas sanas (Berube *et al.*, 2017; Mizukami *et al.*, 2017; Murakami *et al.*, 2020). Generalmente son dietas deficientes en consumo de proteína, ácidos grasos poliinsaturados (Omega 3 y 6), cereales de grano entero, fibra, minerales (potasio y magnesio), verduras, frutas, ácido fólico, vitamina K y vitamina D (Merlino *et al.*, 2004; Berube *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2017; Mizukami *et al.*, 2017; Murakami *et al.*, 2020). Estas deficiencias están relacionadas directamente con el grado de afectación de la enfermedad y con la inflamación, es decir, a menor calidad de la dieta se presenta mayor actividad de la enfermedad o viceversa (Berube *et al.*, 2017; Murakami *et al.*, 2020). Esto puede estar relacionado con distintos mecanismos que involucran la activación del sistema inmune, por ejemplo, un desbalance en la ingesta de omega 3 y 6 está implicado en procesos inflamatorios, al ser precursores de moléculas proinflamatorias como las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, los cuales su incremento se relaciona con una mayor sintomatología y actividad de la enfermedad (Calder, 2012; Di Giuseppe *et al.*, 2014; Moghaddami *et al.*, 2015).

Un consumo adecuado de fibra se ha relacionado con un mayor número de células Treg, esto está ligado a la composición de la microbiota intestinal y su relación con el sistema inmune, se ha reportado que la presencia de microorganismos de clase *Clostridia* favorecen la expresión de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$  del inglés *Transforming growth factor-beta*) que a su vez favorecen la diferenciación de células Treg a nivel intestinal y en cooperación con las células dendríticas tolerogénicas contribuyen a la homeostasis de la permeabilidad intestinal, la cual se relaciona directamente con la disminución de la inflamación sistémica (Furusawa *et al.*, 2013; Masuko, 2018).

Otro nutrimento implicado en funciones inmunológicas inflamatorias es el sodio, del cual se ha reportado que un alto consumo de sodio promueve la polarización de las células T vírgenes al perfil Th17. El mecanismo de polarización sucede a través de la activación de receptores tirosina-quinasa (Src) regulada por glucocorticoides (SGK1, del inglés *Serine/threonine-protein kinase Sgk1*), proteína implicada en la regulación de diferenciación de células Treg y Th17 (Jung *et al.*, 2014; Scrivo *et al.*, 2017).

De manera particular las vitaminas tienen un papel inmunomodulador. Dentro de las cuales destaca la vitamina D, el cual es un nutrimento que ha tomado relevancia como inductor de una respuesta inmune tolerogénica, se ha demostrado que tiene un papel importante en la diferenciación de células Treg en enfermedades autoinmunes como diabetes mellitus tipo 1 y LES (Andreoli *et al.*, 2015; Treiber *et al.*, 2015). En estudios experimentales también se ha visto que en presencia de calcitriol (1,25-dihidroxitamina D<sub>3</sub>), la forma activa de la vitamina D, se inhibe la diferenciación de células Th17 a través del bloqueo de la expresión del Factor nuclear de células T activadas (NFAT del inglés *Nuclear factor of activated T-cells*) y del factor de transcripción RUNX1 (Factor de transcripción relacionado con *Runt*) que se une al promotor de IL-17 e inhibe la expresión de ROR- $\gamma$ t, el factor de transcripción para las células Th17, lo cual favorece la expresión de Foxp3 relacionado con la diferenciación de células Treg (Joshi *et al.*, 2011; Van Hamburg *et al.*, 2011; Zhang, Zhang and Shih, 2013; He *et al.*, 2016). Esto en relación a la constante deficiencia de vitamina D que se presenta en distintas enfermedades autoinmunes como AR, esclerosis múltiple (EM), LES y enfermedad de Chron, se han realizado múltiples estudios de investigación de la potencial asociación entre el estatus de vitamina D en suero con la de variantes genéticas (polimorfismos genéticos) en el receptor de vitamina D (VDR) así como la relación con la gravedad de estas enfermedades (Dankers *et al.*, 2017a; Meza-Meza *et al.*, 2019). De esta manera la suplementación de vitamina D podría ser una posible estrategia terapéutica para el abordaje de las enfermedades autoinmunes (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Consumo dietético y efectos en respuesta inflamatoria por AR**

Componente de la dieta	Modelo experimental	Proteína/célula blanco	Proceso fisiopatológico	Efectos
<b>NaCl</b> (Scriver, R., <i>et al.</i> , 2019, Vitales-Noyola, M., <i>et al.</i> , 2018).	Humanos AR (PBMCs) Italia	Th17 Treg TGF $\beta$ IL-9	Disminuye: Treg Aumentan: Th17 TGF $\beta$ IL-9	Disminuye Respuesta inflamatoria
	Humanos AR (PBMCs) México	Treg Th17 IL-17 IL-2 TNF- $\alpha$	Aumenta: respuesta inflamatoria	Aumenta puntuación índice DAS 28
<b>Dieta alta en grasa</b> (Sik Na, Hiun., <i>et al.</i> , 2017).	Murino DBA/1J modelo AR (in vivo)	Th17 IL-17 IL-6 IL-1 $\beta$ Azgp1	Aumenta: Respuesta inflamatoria y caquexia reumatoide	Aumenta severidad AR
<b><math>\Omega</math>-6/<math>\Omega</math>-3 1:1</b> (Yu, Haomiao., <i>et al.</i> , 2015).	<i>In vitro</i> (Condrocitos humanos) <i>In vivo</i> Modelo murino	MMP13 IL-1	Inhibe activación condrocitos	Reduce respuesta inflamatoria
<b>Vitamina D</b> (Fawaz, L., <i>et al.</i> , 2016).	<i>In vitro</i> (Leucocitos pacientes sanos)	Células T CD4 <sup>+</sup> Th17 IL-17 Treg	Aumenta expresión de Foxp3 y modula Th17	Aumenta expresión de células Treg Modula Th17

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica, Th17: Linfocitos T cooperadores 17, Treg: Linfocitos T reguladores, TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta, IL-9: interleucina 9, IL-2: interleucina 2, IL-17: interleucina 17, IL-1  $\beta$ : interleucina 1-beta, TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral-alfa, Agzp1: Zinc alfa-2-glicoproteína, Foxp3: Forkhead box P3, MMP13: Metaloproteínasa de matriz 13, AR: Artritis reumatoide, DAS 28: Índice 28 de puntuación de actividad de la enfermedad (del inglés *Disease Activity Score-28*).

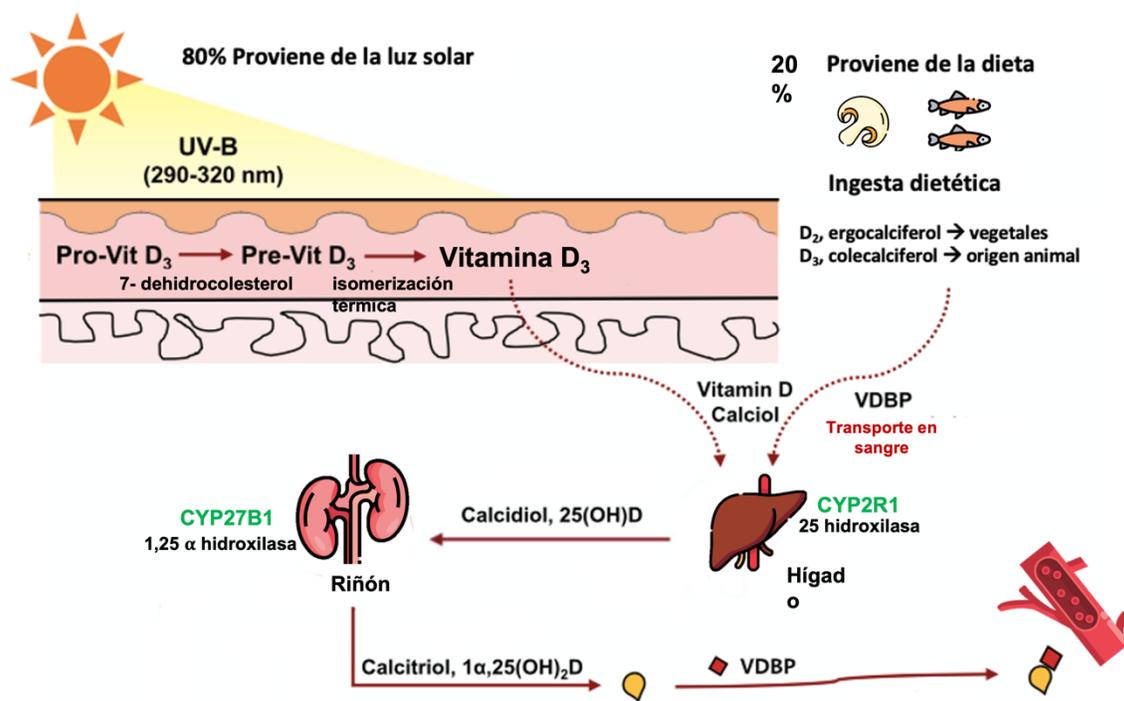
## II.8 Vitamina D en autoinmunidad

### II.8.1. Vitamina D, fuentes y metabolismo

La vitamina D<sub>3</sub> o colecalciferol se obtiene de dos fuentes principales: de la dieta en forma de ergocalciferol (vitamina D<sub>2</sub>) proveniente de las plantas, así como colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>) presente en alimentos de origen animal y representa el 20% de su fuente. Sin embargo, se obtiene mayormente por producción endógena en un 80% a través de una reacción fotoquímica inducida por la exposición a la luz solar (rayos ultravioletas, UVB) en la piel a partir de 7-dehidrocolesterol. Esta

conversión da origen a la previtamina D<sub>3</sub>, para posteriormente ocurrir un proceso de isomerización térmica no enzimática a vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol) (Figura 3).

El colecalfiferol (vitamina D<sub>3</sub>) en la sangre es transportado por la proteína de unión a vitamina D (VDBP del inglés *vitamin D binding protein*) hacia el hígado donde la 25-hidroxilasa (CYP2R1) hidroxila a la vitamina D<sub>3</sub> lo que favorece su conversión a 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (calcidiol o hidroxicolecalfiferol). Posteriormente la VDBP transporta la 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> hacia el riñón para terminar su proceso de activación en el túbulo proximal, donde es hidroxilada por la enzima 1 $\alpha$ -hidroxilasa (CYP27B1) para convertirse en 1,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> (calcitriol) la cual es la forma activa de la vitamina D<sub>3</sub> (Whiting, Calvo and Vatanparast, 2017; Sassi, Tamone and D'amelio, 2018) (Figura 3).



**Figura 3. Síntesis y metabolismo de vitamina D.**

Imagen modificada de Jeon S-M, *et al*, 2018. La síntesis de vitamina D inicia durante la exposición a los rayos UV de la luz solar a partir de la cual se genera una conversión del 7-dehidrocolesterol a previtamina-D<sub>3</sub>, a su vez ésta es convertida a vitamina D<sub>3</sub>, ésta es transportada al hígado unida a la proteína de unión a la vitamina D (VDBP), donde es convertida a 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (calcidiol). Por último, la 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> es transportada al riñón

donde es hidroxilada por la enzima 1,25- $\alpha$  hidroxilasa y se convierte en 1,25 dihidroxivitamina D<sub>3</sub> (calcitriol), la forma activa de la vitamina D.

## II.8.2. Funciones de la vitamina D

Las funciones fisiológicas de la vitamina D son genómicas y no genómicas como respuesta a la interacción con el receptor de vitamina D (VDR, del inglés *vitamin D receptor*) que se expresa en múltiples tipos celulares (células del sistema endocrino, cardiovascular, músculo esquelético, gastrointestinal, renal, reproductor, respiratorio, inmune, sistema nervioso central y piel). En su forma activa actúa por efecto endocrino, autocrino y paracrino (Christakos *et al.*, 2016; Sassi, Tamone and D'amelio, 2018).

A nivel genómico actúa al regular la transcripción de más de 900 genes implicados en la codificación de proteínas de importancia biológica por la acción sobre células epiteliales intestinales, renales, osteoblastos y osteoclastos (Christakos *et al.*, 2016; Y *et al.*, 2017; Sassi, Tamone and D'amelio, 2018).

Los genes blanco que se han caracterizado están relacionados con transportadores de calcio y fosfato, bombas iónicas en intestino y riñón, síntesis de osteoblastos y estímulo de osteoclastos, supresión del gen de 1- $\alpha$  hidroxilasa, enzima reguladora del metabolismo de vitamina D, así como genes implicados en funciones celulares inmunológicas innatas y adaptativas, función de las células  $\beta$ -pancreáticas, adipocitos, control del ciclo celular y mantenimiento de la integridad de las barreras epiteliales y endoteliales (Christakos *et al.*, 2016; G *et al.*, 2016; Y *et al.*, 2017; Sassi, Tamone and D'amelio, 2018).

Así también la vitamina D, induce respuestas genómicas que ocurren en un tiempo menor a la regulación genética, algunas respuestas rápidas reportadas son: la absorción intestinal rápida de calcio, la secreción de insulina por células  $\beta$ -pancreáticas y la migración rápida de células endoteliales (Enith, Blanco and Maya, 2011; Christakos *et al.*, 2016; Y *et al.*, 2017).

### II.8.3. Vitamina D y sistema inmune

Una de las múltiples funciones de la vitamina D es la modulación del sistema inmune. La expresión de VDR en células inmunológicas permite la interacción con forma activa de la vitamina D (calcitriol, 1,25 (OH) D<sub>3</sub>) lo que permite la regulación de la inflamación dependiente de los niveles de séricos de vitamina D (Dankers *et al.*, 2017a).

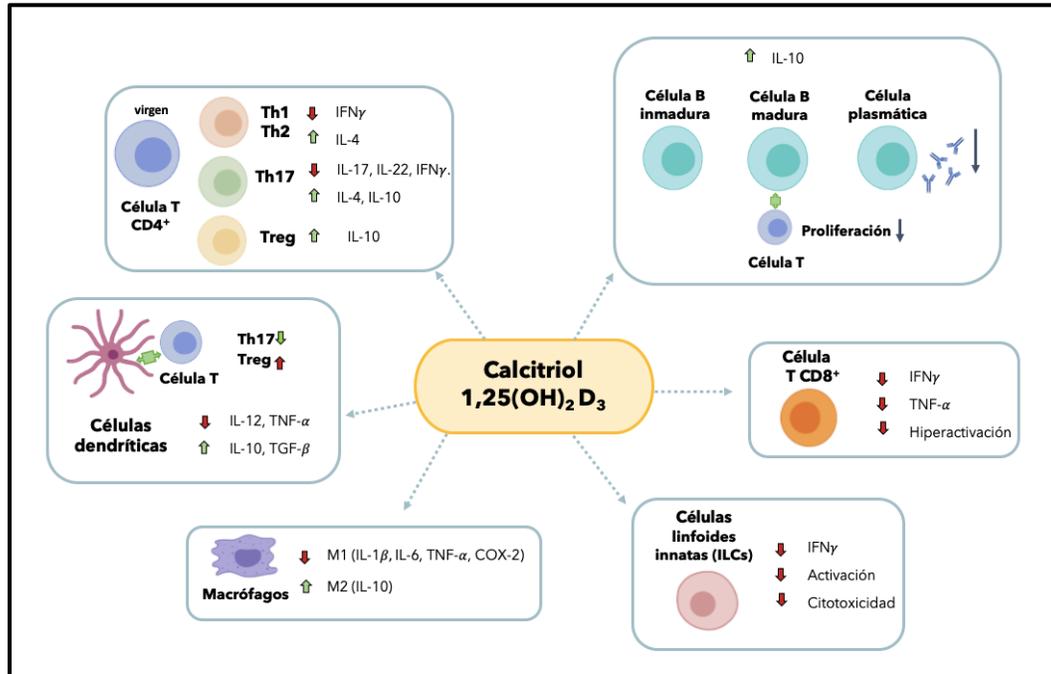
En estudios *in vitro* de células dendríticas se ha reportado que en presencia de calcitriol, (1,25 (OH) D<sub>3</sub>), las células dendríticas permanecen en estado inmaduro-tolerogénico promovido por la producción de IL-12, TNF- $\alpha$  y la producción de la citocina antiinflamatoria IL-10. Estas células dendríticas tolerogénicas (CDt) poseen menor capacidad de inducción proliferativa a células T proinflamatorias y al mismo tiempo inducen la polarización a células Treg y también induce la apoptosis de células T autorreactivas (Dankers *et al.*, 2017a).

En macrófagos, el calcitriol tiene un rol dual, antiinflamatorio y proinflamatorio al promover la polarización de estos a un fenotipo M1 proinflamatorio en estadios tempranos de la infección lo que favorece la respuesta contra antígenos microbianos y la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ . Así también, en presencia de calcitriol se ha reportado la polarización de macrófagos al fenotipo antiinflamatorio M2, así como disminución en la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , óxido nítrico y un aumento en la producción de IL-10 (Dankers *et al.*, 2017a).

En relación a los linfocitos T, la presencia de calcitriol inhibe la producción de interferón gama (IFN $\gamma$ , del inglés *Interferon-gamma*) lo que resulta en una menor polarización de linfocitos T vírgenes al fenotipo Th1, además se ha reportado que el calcitriol induce la producción de IL-4 y la expresión del factor transcripción GATA3, lo cual favorece la polarización de linfocitos T hacia un fenotipo antiinflamatorio Th2, así también la reducción en la expresión de citocinas como IL-17 e IL-22 disminuye la polarización a células Th17, uno de los principales fenotipos relacionados con la autoinmunidad (Dankers *et al.*, 2017a).

El efecto del calcitriol en las células B se caracteriza por la disminución en su proliferación, induce apoptosis e inhibe el cambio de clase de inmunoglobulinas,

incluso inhibe su maduración a células plasmáticas lo que resulta en una menor producción de autoanticuerpos e inducción de la producción de IL-10 e inhibición de su capacidad de presentación antigénica (Dankers *et al.*, 2017a) (Figura 4).



**Figura 4. Calcitriol (1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y sistema inmune.**

Imagen modificada de Dankers, W., *et al.*, 2017. Panorama general de los efectos inmunomoduladores del calcitriol en células del sistema inmune. Las flechas verdes representan la regulación de citocinas antiinflamatorias, así como el aumento en la diferenciación celular y las flechas rojas representan citocinas proinflamatorias y disminución en la diferenciación celular. La presencia de calcitriol favorece la diferenciación de linfocitos T al fenotipo Treg y Th2, en las células dendríticas (DCs) promueve la permanencia de un estado tolerogénico de las mismas y promueve la expresión de IL-10 y TGF- $\beta$ , por otra parte favorece la polarización de macrófagos al fenotipo M2 y la expresión de IL-10 y en células B inhibe su maduración a células plasmáticas, aunado a esto disminuye la producción de auto-anticuerpos.

#### II.8.4. Estudios de asociación del consumo de vitamina D y autoinmunidad

Debido al efecto inmunomodulador de la vitamina D, se ha estudiado la deficiencia sérica y en el consumo de la misma en enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y diabetes mellitus tipo 2 en las cuales se ha reportado la asociación entre la presencia de la enfermedad y niveles bajos de vitamina D, tanto en su consumo como a nivel sérico (Li *et al.*, 2013; Treiber *et al.*, 2015; Pierrot-Deseilligny and Souberbielle, 2017; Shoenfeld *et al.*, 2018; Meza-Meza *et al.*, 2019). Las deficiencias de consumo de fuentes de vitamina

D son comunes en la población general, pero se presentan en mayor proporción en pacientes con enfermedades autoinmunes evaluados en relación con su ingesta diaria recomendada (IDR) y sugerida (IDS) en distintas poblaciones (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Vitamina D y asociación con enfermedades autoinmunes.**

Población	Consumo vitamina D	IDR/IDS	Asociación
Suecia AR (n=727) Lourdudoss, C., <i>et al.</i> , 2017.	Consumo menor al IDR 5.86±2.30 µg/día	10-20 (10-20 µg)	Suplementación vit D = mejor respuesta al tratamiento.
USA AR (n=152) Merlino, A.L., <i>et al.</i> , 2004.	Consumo vitamina D 272.5 UI (AR) vs 336 UI (SC)	600 UI	Mayor riesgo de AR
México LES (n=130) Meza-Meza, M., <i>et al.</i> , 2019.	Consumo menor (3µg)	10 µg	Presencia de LES y consumo deficiente de vitamina D
Japón AR (n=441) Murakami, I., <i>et al.</i> , 2020.	Bajo consumo de pescados y mariscos (fuente de vitamina D)	7 µg	Actividad AR y expresión MMPs Bajo consumo de fuentes de vitamina D

En el Cuadro 4. se muestra la asociación entre el consumo deficiente de vitamina D en relación con la ingesta diaria recomendada (IDR) y sugerida (IDS) de cada país, con la presencia de enfermedades autoinmunes. AR: Artritis reumatoide, LES: Lupus eritematoso sistémico, UI: Unidades internacionales, MMPs: metaloproteinasas, SC: sujetos control.

### II.8.5. Deficiencias séricas de vitamina D en pacientes con AR

En diferentes poblaciones de pacientes con AR se ha reportado una relación negativa entre niveles séricos deficientes de vitamina D y la actividad de la enfermedad de acuerdo con el índice DAS 28, es decir que a niveles más bajos de vitamina D, aumenta la actividad de la enfermedad de acuerdo con el DAS 28. (Cuadro 5).

Los valores séricos de vitamina D se clasifican de acuerdo con los niveles séricos de calcidiol, se consideran como deficiencia valores <20 ng/mL, insuficiencia valores entre 21-30 ng/mL y suficientes valores >30 ng/mL. Valores mayores a 150 ng/mL se han relacionado con intoxicación (E *et al.*, 2014)

**Cuadro 5. Deficiencias séricas de vitamina D y su asociación con AR**

<b>Población</b>	<b>Patología</b>	<b>Niveles séricos de vitamina D</b>	<b>Asociación</b>
Arabia Saudita Sultan, F., <i>et al.</i> , 2015.	AR	89% de pacientes deficiencia de vitamina D 18.73 ng/mL	Correlación negativa niveles vitamina D y DAS 28
Tehran, Iran (Zakeri, Z., <i>et al.</i> , 2016)	AR	Suficientes 30.5 ± 28.9 ng/mL	Correlación negativa niveles vitamina D y DAS 28
Bangkok, Thailandia. (Pakchotanon, R., <i>et al.</i> , 2013).	AR	Insuficiencia relativa 28.79 ng/mL	No correlación de vitamina D y DAS 28.
Hatay, Turquía. (Turhanoflu, A., <i>et al.</i> , 2011).	AR	Suficientes 30.24 ng/mL	Correlación negativa niveles vitamina D y DAS 28. 17.91 ng/mL → DAS 28 5.9±0.6
Genova, Italia. (Vojinovic, J., <i>et al.</i> , 2017).	AR	Deficientes 17.62 ng/mL	Correlación negativa Vitamina D y DAS 28

Distintos factores están involucrados en la deficiencia de vitamina D a nivel sérico, como la ubicación geográfica, la exposición a luz solar, el consumo adecuado y suficiente de alimentos fuentes de vitamina D y también es importante considerar la presencia de variantes genéticas (polimorfismos) que existen en el gen del receptor de vitamina D (*VDR*).

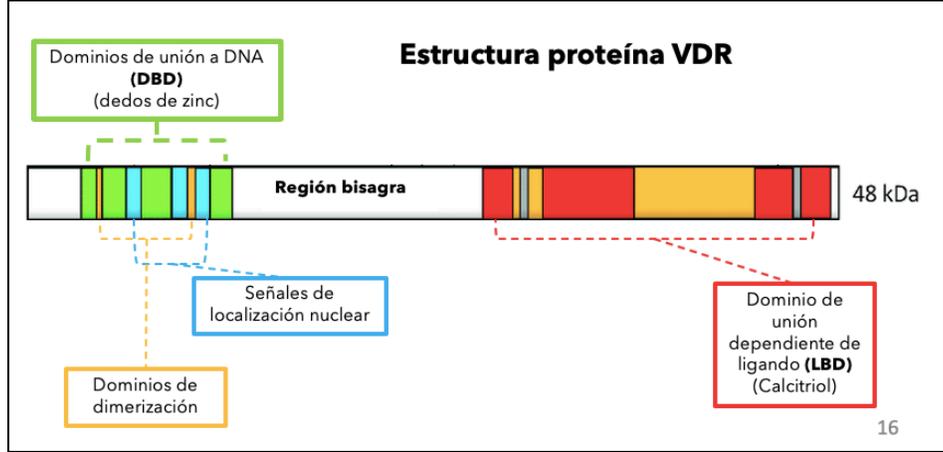
## **II.9. Receptor de vitamina D y polimorfismos**

### **II.9.1. Receptor de vitamina D**

El VDR se expresa en células del sistema endócrino, cardiovascular, músculo esquelético, sistema gastrointestinal, renal, reproductor, neuronas, piel y en células del sistema inmune (linfocitos T y B y células presentadoras de antígenos (macrófagos y dendríticas), debido a la diversidad de células en las que se expresa el VDR, la actividad de la vitamina D se considera pleiotrópica al ser la expresión

del gen de *VDR*, responsable de efectos fenotípicos y funcionales distintos en el organismo (Daniel D. Bikle, 2014; Christakos *et al.*, 2016; Dankers *et al.*, 2017a).

El receptor de vitamina D es un factor de transcripción miembro de la familia de los receptores nucleares de hormonas esteroideas. Su estructura proteica está compuesta principalmente por tres dominios: 1) En su residuo amino terminal se encuentra el dominio de unión a una secuencia hexamérica conservada (5'...AGAACA...3') que se repite dos veces en el ácido desoxirribonucleico (ADN) con un separador de 3 nucleótido que conforma al genoma denominado elemento de respuesta a vitamina D (VDRE, del inglés *Vitamin D response element*), contiene además dos dedos de zinc que se van a unir a los surcos del ADN, 2) En su residuo carboxi terminal se ubica el dominio de unión a ligando (LBD del inglés *Ligand Binding Domain*) que interacciona con el calcitriol y 3) Una región bisagra que une ambos dominios y permite la interacción del VDR con el receptor X de ácido retinoico (RXR, del inglés *Retinoid X receptor*) para la posterior formación del heterodímero (VDR-RXR) y ejercer las acciones genómicas del calcitriol vía VDR (Figura 5)(Daniel D. Bikle, 2014; Zenata and Vrzal, 2017).

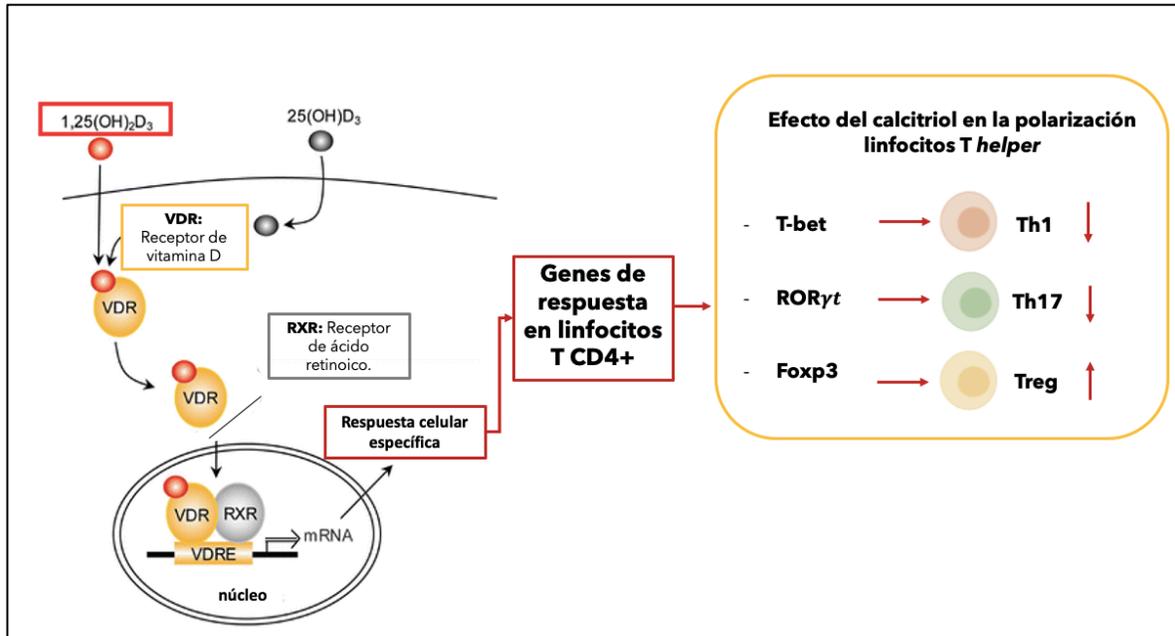


**Figura 5. Estructura del receptor de vitamina D (VDR).**

Imagen modificada de (Zenata and Vrzal, 2017). El receptor de vitamina D (VDR) está conformado por un dominio ubicado en su residuo amino terminal de unión a DNA, sitio que se une a las regiones VDRE, otro dominio ubicado en su residuo carboxi terminal que corresponde al sitio de unión dependiente de ligando (LBD) y una región bisagra que une los anteriores y facilita la formación del heterodímero VDR-RXR en el núcleo.

La interacción del calcitriol-VDR es de tipo endocrina, el calcitriol sérico ingresa a la célula blanco por difusión pasiva y posteriormente se une al receptor de vitamina D (VDR) en el citoplasma de la célula, este complejo calcitriol-VDR va a interactuar con el receptor de ácido retinoico (RXR) en el núcleo lo que conlleva a la formación de un heterodímero. Este heterodímero se trasloca en el núcleo celular para unirse a secuencias específicas del VDRE. La unión calcitriol/VDR/RXR-VDRE va a promover el reclutamiento de complejos reguladores de la expresión de genes específicos de la célula blanco. Por ejemplo, en linfocitos T CD4<sup>+</sup> la interacción calcitriol/VDR/RXR-VDRE va a regular a la alza la expresión de factores de transcripción (ROR $\gamma$ T y SMAD7) que están relacionados con la polarización de

células T a células Th17 y Th1 respectivamente (Daniel D. Bikle, 2014; Christakos et al., 2016).



**Figura 6. Interacción genómica entre el calcitriol y el receptor de vitamina D.**

El calcitriol que se encuentra soluble ingresa a la célula por difusión pasiva donde se une a VDR, posteriormente VDR se trasloca al núcleo y forma un heterodímero con el receptor de ácido retinoico (RXR), este heterodímero VDR-RXR se une a las regiones VDRE en el ADN modulando la expresión de factores de transcripción.

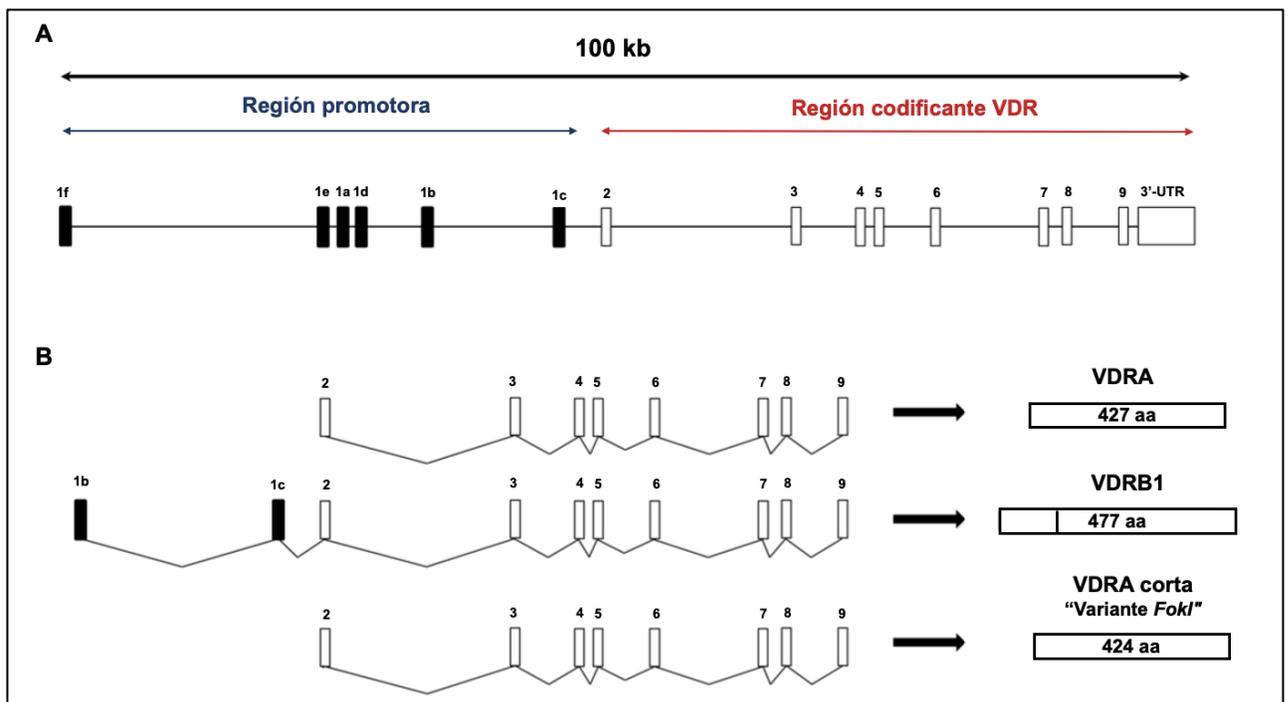
## II.9.2. Gen del receptor de vitamina D

El gen *VDR* está ubicado en el cromosoma 12 (12q13.11), está formado por 14 exones (100 kb) y se puede dividir en dos regiones (Figura 7A), una región promotora y una región codificante. El primer exón se encuentra en la región promotora donde se ubican 6 variantes importantes para el empalme alternativo de las isoformas de VDR, en la región codificante se ubican los exones 2-9 los cuales codifican para sus distintas isoformas (Jehan, d'Alésio and Garabédian, 2007; Zenata and Vrzal, 2017).

Actualmente se han reportado tres isoformas: dos isoformas denominadas VDRA y VDRB1 que se originan por corte y empalme alternativo y la tercera isoforma

VDRA corta, es generada por la presencia del polimorfismo *FokI* en el codón de inicio de su traducción. VDRA está compuesto por 427 aminoácidos (48kDa) mientras que VDRA corta por 424 aminoácidos.

La isoforma VDRB1 presenta una elongación de 50 aminoácidos en su dominio amino terminal, esta elongación se debe a que el sitio de inicio de la traducción (ATG, metionina) de VDRB1 se ubica en el exón 1d y en el caso de la isoforma VDRA su sitio de inicio de la traducción se ubica en el exón 2, este alargamiento proporciona diferentes reacciones de afinidad a su ligando (calcitriol) de acuerdo con el tipo de tejido donde se esté expresando. Estas isoformas de VDR se han encontrado en riñón humano y en líneas celulares de epitelio intestinal y renal. La tercera isoforma tiene como resultado una versión más corta de VDRA (424 aminoácidos) y es generada debido a la presencia del polimorfismo *FokI* ubicado en el exón 2 (Zenata and Vrzal, 2017) (Figura 7B).



**Figura 7. Representación esquemática VDR y sus isoformas.**

Imagen modificada de (Zenata and Vrzal, 2017). A. El gen de VDR está formado por 14 exones que se dividen en una región promotora y una región codificante. B. Existen 3 isoformas que tienen su

origen por corte y empalme alternativo, VDRA formada por 427 aa, VDRA en su versión corta de 424 aa que se genera por la presencia del polimorfismo *FokI* en el exón 2 y VDRB1 que es una versión 50 aa más larga debido a que su sitio de inicio de la traducción se ubica en el exón 1d.

### II.9.3. Polimorfismos en el VDR

Se han descrito varios polimorfismos en *VDR* y su potencial asociación con características clínicas asociadas a la severidad en pacientes con enfermedades autoinmunes. La frecuencia y distribución de estos polimorfismos en su mayoría polimorfismos de nucleótido único (SNP, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) varía entre grupos étnicos, por lo tanto se ha sugerido que deficiencias en los niveles de vitamina D y la presencia de polimorfismo en *VDR* son factores de riesgo genético que en interacción con el ambiente contribuyen al desarrollo y severidad de las enfermedades autoinmunes como AR (Bizzaro *et al.*, 2017a).

Los 4 polimorfismos más estudiados en el gen *VDR* son *FokI*, *BsmI*, *Apal* y *TaqI*, denominados así por la enzima de restricción con la cual fueron identificados. Cada SNP tiene una ubicación distinta en el gen de *VDR*, un intercambio de nucleótido característico y por lo tanto, un efecto funcional diferente en cada caso (Li *et al.*, 2013; Bodoki *et al.*, 2015; Rivera-Leon *et al.*, 2015; Zenata and Vrzal, 2017; Mahto *et al.*, 2018; Triantos *et al.*, 2018) (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Características moleculares de los polimorfismos *FokI*, *BsmI*, *Apal* y *TaqI* en *VDR*.**

Polimorfismo (SNP)	Ubicación	Cambio de nucleótido en el ADN	Nomenclatura por endonucleasa	Efecto funcional
<i>FokI</i> rs2228570	Exón 2	C>T	F>f	En presencia del alelo C se genera una isoforma más corta de 424 aa, debido a la generación de un sitio de inicio de la traducción 9 nucleótidos río abajo del sitio de inicio convencional de la traducción. Esto genera una proteína más activa en su capacidad de transactivación como factor de transcripción.
<i>BsmI</i> rs1544410	Intrón 8	A>G	B>b	El cambio de nucleótido no altera la proteína, sin embargo, afecta la expresión génica a través de la regulación de la estabilidad del ARNm y puede generar una alteración en los sitios de empalme para la transcripción del ARNm o un cambio en los elementos reguladores intrónicos
<i>Apal</i> rs7975232	Intrón 8	A>C	A>a	
<i>TaqI</i> rs731236	Exón 9	C>T	T>t	Genera una variante sinónimo de la secuencia de codificación. Influye en la regulación de la estabilidad del ARNm del <i>VDR</i> .

Referencia: ((G. Kerr Whitfield *et al.*, 2001; Uitterlinden, Fang, Van Meurs, *et al.*, 2004)

Se ha hipotetizado que la presencia de estos polimorfismos (*FokI*, *BsmI*, *ApaI* y *TaqI*) en VDR incrementan el riesgo genético de padecer una enfermedad autoinmune (Bizzaro *et al.*, 2017b; Bae and Lee, 2018).

En relación con la AR se ha asociado la presencia de estos polimorfismos con el riesgo de padecer la enfermedad, e incluso con mayor actividad de la misma. Un metaanálisis realizado en 2014 reportó un a asociación significativa entre los polimorfismos *TaqI* y *BsmI* con la enfermedad, sin embargo, reportaron que el origen étnico, la edad y la ubicación geográfica podrían influir en la asociación reportada (Tizaoui and Hamzaoui, 2015; John *et al.*, 2017).

Dos estudios realizados en pacientes con AR en población tunecina y española reportaron asociación entre el alelo de riesgo FF en el polimorfismo *FokI* con la presencia de AR, mayor actividad de la enfermedad respectivamente y deficiencia de vitamina D (Karray *et al.*, 2012a; Rodríguez-Carrio *et al.*, 2019).

En población pakistaní y egipcia se reportó asociación entre la presencia de los cuatro polimorfismos (*FokI*, *BsmI*, *ApaI* y *TaqI*) y la presencia de AR (Mosaad *et al.*, 2014; Mukhtar *et al.*, 2019)(Cuadro 7).

**Cuadro 7. Estudios de asociación en AR con los polimorfismos en VDR.**

Población	Genotipo o haplotipo de riesgo	Asociación	Autor y año
Túnez (África del norte)	<i>FokI</i> : FF	Mayor frecuencia en pacientes con AR	Karray, E., <i>et al.</i> , 2012
España	<i>FokI</i> : FF	VDR polimorfismos y relación con niveles de vitamina D y actividad clínica AR.	Rodríguez-Carrio, J., <i>et al.</i> , 2019.
Pakistan	<i>FokI</i> , <i>BsmI</i> , <i>ApaI</i> , <i>TaqI</i> . FBAT	Presencia de polimorfismos VDR, deficiencia de vitamina D y presencia AR.	Mukhtar, M., <i>et al.</i> , 2019.

<b>Egipto</b>	<i>Fokl, Bsml, Apal, Taql.</i> FBAT	Presencia polimorfismos VDR = susceptibilidad AR. <i>Fokl: Ff = BAJA densidad ósea.</i>	Mosaad, Y., <i>et al.</i> , 2014.
---------------	--	---	-----------------------------------

VDR: Receptor de vitamina D, AR: Artritis reumatoide.

La presencia de los polimorfismos va a dar origen a un haplotipo, se ha reportado en población egipcia como haplotipo de riesgo para AR la presencia de los alelos FBAT y en los cuatro polimorfismos (*Fokl, Bsml, Apal, Taql*) (Mosaad *et al.*, 2014).

## II.10 Niveles séricos de VDR soluble (sVDR)

Se ha sugerido que la vitamina D desempeña un papel importante en muchas actividades fisiológicas, el metabolismo óseo, absorción de calcio a nivel intestinal así como la modulación del sistema inmune (Dankers *et al.*, 2017a).

Se ha reportado que la deficiencia de vitamina D está involucrada en el desarrollo de numerosas afecciones como enfermedades autoinmunes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, osteoartritis, enfermedades inflamatorias e infecciosas, trastornos mentales y cutáneos (Celikbilek *et al.*, 2014; Altun *et al.*, 2018; Aktürk *et al.*, 2019; Kültür *et al.*, 2019; Al-Ghafari, Balamash and Al Doghaither, 2020).

Para que la vitamina D ejerza sus funciones debe unirse al VDR. El VDR es un factor de transcripción de la familia de los receptores nucleares dependiente de ligando que se encuentra en el citoplasma de la célula, este receptor es ubicuo y está presente en múltiples tejidos (Christakos *et al.*, 2016).

La evidencia donde se relacionan los niveles de vitamina D y VDR en suero conocido como VDR soluble (sVDR) no es concluyente, se ha reportado que en enfermedades inflamatorias como la migraña, cáncer y autoinmunes como la espondilitis anquilosante hay presencia de sVDR en suero sanguíneo la cual se relaciona con una mayor actividad de la enfermedad y con estadios más avanzados

en el caso de cáncer colorrectal (Celikbilek *et al.*, 2014; Kültür *et al.*, 2019; Al-Ghafari, Balamash and Al Doghaither, 2020).

sVDR al ser un receptor nuclear no debería encontrarse de forma soluble; sin embargo, se ha hipotetizado que el ser detectado en suero en patologías de carácter inflamatorio pudiera estar relacionado con daño o muerte celular de carácter inflamatorio como la piroptosis. La piroptosis es un tipo de lisis celular regulada por el inflamosoma, un complejo proteico que se encuentra en el citoplasma de células del sistema inmune innato, el inflamosoma tiene actividad proteolítica la cual se desencadena en procesos inflamatorios bajo la presencia de la interleucina IL-1 $\beta$ , en este tipo de muerte celular existe liberación de cuerpos intracelulares al medio (Beere and Green, 2017).

La activación del inflamosoma y la presencia de piroptosis de forma exacerbada se ha reportado en enfermedades autoinmunes y en daño tisular, ambas características de la artritis reumatoide, por lo tanto, se propone analizar la relación del estatus de vitamina D y la presencia de sVDR en pacientes con AR (Spel and Martinon, 2020).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune degenerativa que afecta la calidad de vida de quienes la padecen. La dieta se ha descrito como un factor involucrado en el desarrollo y progresión de esta patología. El consumo bajo de nutrientes inmunomoduladores como la vitamina D se ha relacionado con la deficiencia sérica de calcidiol, calcitriol y mayor actividad clínica de la enfermedad.

El receptor de vitamina D (VDR) se expresa en distintas células del sistema inmune donde actúa como un factor de transcripción; modula la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune y con la regulación de las concentraciones de calcidiol y calcitriol.

La deficiencia sérica de vitamina D en AR se ha relacionado con la presencia de polimorfismos en *VDR* y su expresión en células del sistema inmune podría estar asociado con el desarrollo de autoinmunidad. Las variantes genéticas más estudiadas en *VDR* son *FokI*, *BsmI*, *Apal* y *TaqI*. Las cuales se han descrito asociadas a las deficiencias séricas de vitamina D y cambios en la homeostasis inmunológica de las células Th17/Treg y sus citocinas.

En estudios previos de pacientes con AR no se ha reportado la asociación de los polimorfismos en *VDR*, ni la expresión de su mRNA, niveles séricos de sVDR, así como su relación con los niveles séricos de calcidiol, calcitriol o cambios en la expresión del mRNA las subpoblaciones Th17/Treg y sus citocinas.

Por lo tanto, es de nuestro interés evaluar si existe alguna asociación entre estas variables con la actividad clínica de la AR.

#### **IV.HIPÓTESIS**

La presencia de los alelos de riesgo *TGCT* en *VDR* se asocia con una baja expresión de su mRNA, deficiencia de calcidiol/calcitriol, niveles séricos altos de sVDR, disminución en la expresión de citocinas Treg y un aumento en la expresión de citocinas Th17 relacionadas con una actividad clínica mayor de la artritis reumatoide.

## V. OBJETIVOS

### V.1. Objetivo general

Determinar la asociación de los polimorfismos en *VDR* con la expresión de su mRNA, niveles séricos de calcidiol, calcitriol, sVDR y perfiles Th17/Treg en pacientes con artritis reumatoide.

### V.2 Objetivos particulares

1. Comparar los niveles séricos de calcidiol, calcitriol, la relación calcitriol/calcidiol y sVDR en ambos grupos de estudio
2. Relacionar los niveles séricos de calcidiol, calcitriol, la relación calcitriol/calcidiol y sVDR, con las variables clínicas de la AR
3. Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos *FokI*, *BsmI*, *Apal* y *TaqI* en *VDR* en pacientes con AR y sujetos control
4. Inferir el desequilibrio de ligamiento, haplotipos y haplogenotipos de los polimorfismos en *VDR* en ambos grupos de estudio
5. Asociar los polimorfismos en *VDR* con los niveles séricos de calcidiol, calcitriol, la relación calcidiol/calcitriol, sVDR y las variables clínicas de la AR
6. Asociar la expresión del mRNA de *VDR*, *RORC* y *FOXP3* en leucocitos de sangre periférica de acuerdo con los niveles séricos de calcidiol, calcitriol, sVDR y de los polimorfismos de riesgo en *VDR* en pacientes con AR y en SC
7. Determinar la asociación de los niveles séricos de calcidiol, calcitriol, la relación calcidiol/calcitriol, sVDR y de los polimorfismos de riesgo en *VDR* con los niveles séricos de citocinas de los perfiles Th17 (IL-6, IL-13, IL-17A y TNF- $\alpha$ ) y Treg (IL-10 y TGF- $\beta$ ) en pacientes con AR y en SC

## **VI. DISEÑO METODOLÓGICO**

### **VI.1. Tipo de estudio**

De casos y controles.

### **VI.2. Sede del estudio**

- Red de Inmunonutrición y Genómica Nutricional en las Enfermedades Autoinmunes del Laboratorio de Microscopía confocal, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.
- Servicio de Reumatología del Hospital Civil Fray Antonio Alcalde, Guadalajara, Jalisco

### **VI.3. Consideraciones éticas**

El proyecto se encuentra aprobado por los Comités de investigación, ética en investigación y de bioseguridad del CUCS (CI-1929 2019) y el Comité de Ética en Investigación del Antiguo Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” (280/19). Así mismo el proyecto se realizó considerando la Ley general de Salud y bajo los lineamientos de la Declaración de Helsinki.

### **VI.4. Consideraciones de bioseguridad**

Los residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI) que se generen en esta investigación serán materiales punzocortantes y hemoderivados. Éstos se identificarán y se depositarán en bolsas, recipientes y/o contenedores recolectores, de acuerdo con lo señalado en la NOM-087- ECOL-SSA1- 2002.

### **VI.5. Universo de estudio**

Pacientes con artritis reumatoide (AR) clasificadas de acuerdo a los criterios del ACR/EULAR 2010 que acuden al Servicio de Reumatología del Hospital Civil Fray Antonio Alcalde, Guadalajara, Jalisco y SC femeninos del Occidente de México.

### **VI.6. Periodo de estudio**

Febrero 2020 a Enero 2024.

## **VI.7 Criterios de selección de los grupos de estudio**

### **VI.7.1. Criterios de inclusión**

- Generales de ambos grupos de estudio
  - Mayores de 18 años
  - Sexo femenino
  - Mestizas mexicanas: 3 generaciones de residencia en la región del Occidente de México con ascendencia de los siguientes estados: Jalisco, Nayarit, Michoacán, Colima, Zacatecas, Aguascalientes y Guanajuato (Aguilar-Velázquez *et al.*, 2016).
  - No consumo excesivo de bebidas alcohólicas (3 días previos a la evaluación)
- Grupo AR
  - Diagnóstico y clasificación de AR de acuerdo con los criterios del ACR/EULAR 2010
  - Con cualquier grado de actividad de la enfermedad
  - IMC  $>16 \text{ kg/m}^2$  y  $<40 \text{ kg/m}^2$
  - Sin presencia de enfermedades autoinmunes sobrepuestas
- Grupo sujetos control (SC)
  - Sin presencia de enfermedades autoinmunes o estados crónicos alérgicos
  - Sin indicación de medicamentos anti-inflamatorios, hormonales, tratamiento anticonceptivo hormonal
  - Sin antecedentes familiares de enfermedades autoinmunes
  - IMC  $>16 \text{ kg/m}^2$  y  $<40 \text{ kg/m}^2$

### **VI.7.2. Criterios de no inclusión**

- Embarazo
- Procesos tumorales
- Diagnóstico de VIH o Hepatitis
- Presencia de infección reciente ( $<3$  días)

### **VI.7.3 Criterios de exclusión**

- Muestra sanguínea insuficiente
- Evaluación incompleta del estado nutricional
- Infección reciente o actual

## VI.8 Cálculo del tamaño de muestra

El tamaño de la muestra se calculó utilizando el programa estadístico la calculadora OpenEpi versión 3, basado en la fórmula de Fleiss con corrección de continuidad (CC) y con nivel de confianza del 95% y una probabilidad de detección del 80%, con un OR máximo estimado de 2 para polimorfismos de penetrancia baja.

$$P1 = \frac{P2OR}{1 + P2(OR - 1)}$$

Se tomó como referencia los datos del estudio de Rivera-León *et al.*, realizado en población del Occidente de México (Rivera-León *et al.*, 2015), en el cual los alelos polimórficos t de *TaqI* y a de *Apal* presentaron una frecuencia del 44% en el grupo control. De acuerdo con el cálculo, 144 alelos de t de *TaqI* y 144 alelos de a *Apal* son necesarios para detectar una diferencia similar del 44% en la distribución de ambos polimorfismos en este estudio; por lo cual, sería necesario incluir de manera mínima 72 sujetos (diploidía 2n) en cada grupo para detectar en nuestra población las frecuencias reportadas en ese estudio previo del alelo menor de ambos polimorfismos.

Para incrementar el poder estadístico se incluirán por conveniencia 200 SC y 200 pacientes con AR de acuerdo con los criterios del ACR/EULAR 2010 y el muestreo será por inclusión continua.

## VI.9 Variables

### VI.9.1 Variables independientes

- Presencia de AR
- Genotipos y alelos de los polimorfismos en *VDR*: *FokI* (rs2228570), *TaqI* (rs731236), *BsmI* (rs1544410) y *Apal* (rs7975232).
- Haplotipos y haplogenotipos funcionales en *VDR*
- Expresión de mRNA de *VDR*

### VI.9.2 Variables dependientes

- Niveles séricos de *VDR* (Receptor de vitamina D)
- Niveles séricos de calcidiol (ng/mL)

- Niveles séricos de calcitriol (pg/mL)
- Cuantificación de subpoblaciones Th17/Treg

## **VI.11 Métodos**

### **VI.11.1 Valoración clínica**

#### **VI.11.1.1 Inclusión de participantes**

A partir de una revisión de expedientes de las pacientes que acuden al servicio de reumatología en el periodo de febrero del 2020 a febrero del 2023, se identificaron a las pacientes que cumplían con los criterios de inclusión, posteriormente se realizó la invitación para participar y se les explicó en qué consistía el estudio. Al firmar el consentimiento informado se inició el llenado de la historia clínica. La inclusión de SC se realizó mediante invitación en diversos sitios de la ciudad y redes sociales; se incluyeron a aquellas que cumplían con los criterios del cuestionario de filtrado. En ambos grupos se les asignó un folio de una secuencia numérica continua conforme fue el ingreso al estudio, para su identificación en el análisis de datos y conservar la confidencialidad de su información.

#### **VI.11.1.2 Índices de actividad clínica**

Con ayuda del médico reumatólogo se realizó la evaluación del Índice de actividad DAS28 y el índice de cronicidad de acuerdo con la ACR/EULAR 2010, así como la obtención de los datos clínicos y bioquímicos de cada paciente con AR al momento de la consulta médica.

#### **VI.11. 2 Toma de muestras sanguíneas**

Con ayuno previo de 12 horas, se realizó la toma de muestra sanguínea venosa (20 mL) en la región antecubital de la paciente por personal capacitado en esta actividad y con material nuevo y estéril. La muestra se distribuyó en un tubo seco para obtención de suero y 3 tubos con anticoagulante EDTA (del inglés *ethylene diamine tetra acetate*) para obtención de DNA.

El análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de Microscopía de alta resolución I del CUCS. Los valores de biometría hemática se obtuvieron de los análisis bioquímicos que se realizan las pacientes para su cita de control.

### VI.11.2.1 Cuantificación de los niveles séricos de calcidiol [25-(OH) D<sub>3</sub>] y calcitriol [1,25-(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>]

Se utilizaron kits ELISA de unión competitiva en fase sólida, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Cuadro 7) y se interpretaron con base a valores de referencia (Cuadro 8).

**Cuadro 8. Especificaciones de los kits de ensayo ELISA para calcidiol y calcitriol**

Metabolito y Kit	Rango de detección	Sensibilidad	Longitud de onda de detección
Human soluble 25-OH Vitamin D ELISA kit Eagle Biosciences®	4 – 120 ng/mL	1.6 ng/mL	Medición fotométrica: 450 nm Longitud de onda de referencia: 620-650 nm
Human soluble 1,25-dihydroxyvitamin D3 ELISA kit Cusabio®	1000 fmol/L- 5000 fmol/L	<250 fmol/L	450 nm

**Cuadro 9. Valores de referencia para calcidiol y calcitriol**

Metabolito	Valores de referencia
25-OH vitamina D (calcidiol) <sup>a,b</sup>	<b>Suficiencia:</b> >30 ng/mL <b>Insuficiencia relativa:</b> ≥20-<30 ng/mL <b>Deficiencia:</b> <20 ng/mL
1,25-dihidroxivitamina D <sub>3</sub> (calcitriol) <sup>c</sup>	<b>Normal:</b> 15-60 pg/mL

<sup>a</sup> Inseto kit EKISA Eagle Biosciences. <sup>b</sup>Torres del Pliego & Nogués-Solán, 2014. <sup>c</sup>Ávila *et al.*, 2007; Need *et al.* 2002.

- **Determinación de calcidiol [25 (OH) D<sub>3</sub>]**

#### Fundamento de la técnica:

Como primer paso del análisis, los calibradores y las muestras de los pacientes se diluyeron con un análogo de la 25-OH vitamina D marcada con biotina y se agregó a los pocillos de la microplaca que estaba recubierta con anticuerpos monoclonales anti-25-OH Vitamina D. Durante la incubación, una cantidad desconocida de 25-OH Vitamina D presente en la muestra del paciente y una cantidad conocida del análogo de 25-OH vitamina D marcada con biotina, compitieron por los sitios de unión de anticuerpos presentes en la microplaca. Posteriormente se realizó un lavado para eliminar la 25-OH vitamina D que no se unió. Para la detección de 25-OH vitamina D marcada con biotina que permaneció unida, se realizó una segunda incubación

con estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés *Horseradish Peroxidase*). En una tercera incubación se utilizó el sustrato de la HRP, la tetrametilbencidina (TMB, del inglés *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine*), por lo que la HRP unida catalizó una reacción enzimática-colorimétrica. La reacción se detuvo con la adición de la solución de paro y la placa de microtitulación se leyó a una longitud de onda de 450 nm, con corrección a 630 nm, la intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de vitamina D 25-OH.

- **Determinación de calcitriol (1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>)**

**Fundamento de la técnica:**

Se generó una reacción de inhibición competitiva entre los análogos de 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> marcados con biotina y conjugados con HRP y el antígeno no marcado presente en la muestra de suero, por los anticuerpos específicos para el analito de interés que recubrían el fondo de los pocillos de la microplaca. Se realizó una incubación y se realizó un lavado para detener la reacción de competencia y descartar el conjugado sin unir. Se añadió la solución de sustrato TMB y se incubó. El desarrollo de color se detuvo con una solución de paro y la placa de microtitulación se leyó a una longitud de onda de 450 nm, con corrección a 620nm. La cantidad de recambio del sustrato se determinó coloriméricamente al medir la absorbancia, que fue inversamente proporcional a la concentración total del metabolito en la muestra.

**VI.11.3 Cuantificación de los niveles séricos de sVDR**

Se utilizó el kit de ELISA tipo sandwich para sVDR siguiendo el protocolo del fabricante (Cuadro 10).

**Cuadro 10. Especificaciones del kit de ELISA para sVDR**

Metabolito y Kit	Rango de detección	Sensibilidad	Longitud de onda de detección
Soluble human vitamin D Receptor	6.25 pg/mL - 400 pg/mL	Mínima dosis detectable 1.56 pg/mL	450 nm

(VDR) ELISA kit (CUSABIO)			
------------------------------	--	--	--

- **Determinación de receptor de sVDR en suero**

**Fundamento de la técnica:**

Este ensayo se basó en la técnica cuantitativa de inmunoensayo enzimático (ELISA) en sándwich. La microplaca estaba recubierta con un anticuerpo específico para sVDR. Los estándares y las muestras se pipetearon en los pocillos. Las muestras se incubaron y el sVDR presente en las muestras se unió al anticuerpo previamente fijado en la placa. Posteriormente se descartó el sobrenadante para eliminar cualquier sustancia no unida, después se agregó un anticuerpo conjugado con biotina específico para otro epítipo de sVDR a los pocillos y se dejó incubar. A continuación, se realizó un lavado y se agregó peroxidasa de rábano conjugada con avidina (HRP) a los pocillos. Por último, se realizó un lavado para eliminar cualquier residuo de avidina-HRP no unido y se agregó una solución de sustrato (TMB) a los pocillos. La intensidad del color fue proporcional a la cantidad de sVDR unida en el paso inicial. La reacción colorimétrica se detuvo y se mide la intensidad del color a 450 nm dentro de los siguientes 5 min.

**VI.11.4 Determinación de los polimorfismos *FokI*, *BsmI*, *Apal* y *TaqI* en VDR.**

**VI.11.4.1 Genotipificación**

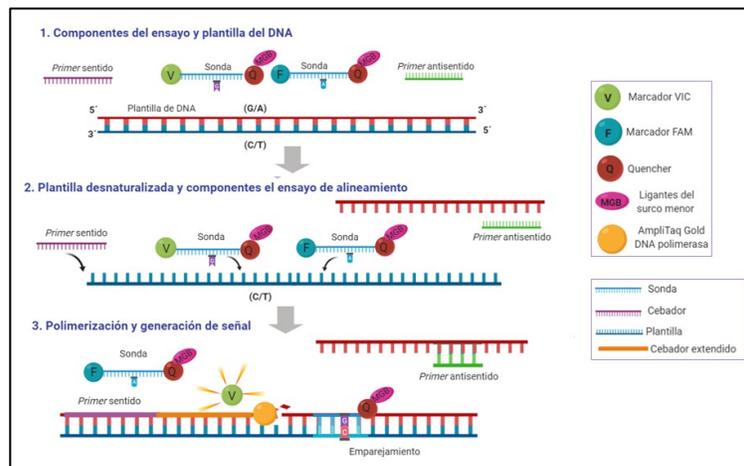
Se realizó mediante ensayos de genotipificación por discriminación alélica basados en la química de las sondas TaqMan®, que consisten en el uso de pares de *primers* de PCR pre-optimizados y dos sondas para la discriminación alélica que se utilizan para amplificar y detectar alelos específicos en el DNA genómico (DNAg).

**Fundamento de la técnica:**

La técnica se basó en la reacción de PCR (del inglés, *polymerase chain reaction*) de punto final, sólo que la detección de los productos amplificados sucedió en cada ciclo de la reacción, la cual se basó en el uso de moléculas o reporteros

fluorescentes que emiten una señal que sirve para detectar los productos amplificados. El método de sondas TaqMan siguió el principio de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET, del inglés *fluorescent resonance energy transfer*) para la generación de la señal, se basó en hidrólisis de la sonda y la liberación de su *quencher* de las sondas fluorescentes de oligonucleótidos etiquetados con un reportero fluorescente (VIC o FAM) en el extremo 5' y una molécula aceptora o *quencher* en el extremo 3', que se encuentran en estrecha unión, mientras la sonda no hibride a su secuencia blanco.

Cuando la sonda hibridó, ocurrieron cambios conformacionales en estas moléculas y la actividad exonucleasa 5'→3' de la enzima *Taq* polimerasa rompió su unión y logró que la fluorescencia emitida por el reportero sea liberada y capturada por el equipo. Mientras no haya unión de la sonda a su secuencia blanco, no habrá señal de fluorescencia o amplificación de la señal (Tamay de Dios *et al.*, 2013) (Figura 8).



**Figura 8. Fundamento ensayo discriminación alélica por sondas *TaqMan*®.**

Imagen modificada de ThermoFisher.

### VI.11.5 Estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos en *VDR*

Para la descripción estadística de los polimorfismos (Cuadro 10) primero se estimó la frecuencia en la población de cada alelo y de cada genotipo a partir de los resultados obtenidos en la técnica de discriminación alélica por sondas *TaqMan*®.

El cálculo de las frecuencias genotípicas y alélicas se realizó por conteo directo: para las frecuencias alélicas se duplicó la muestra tomando como unidad de observación el cromosoma (cada individuo contribuye con 2 cromosomas) y se calculó la proporción de cada alelo. Para las frecuencias genotípicas, se calculó la proporción de individuos con cada genotipo.

**Cuadro 11. Características de los polimorfismos en VDR**

SNP	Localización	Cromosoma	Cambio de base	Genotipos posibles		
				Silvestre	Heterocigoto	Homocigoto
<i>FokI</i> (rs2228570)	Exón 2	12:47879112	C>T	FF	Ff	ff
<i>BsmI</i> (rs1544410)	Intrón 8	12:47836052	A>G	BB	Bb	bb
<i>TaqI</i> (rs731236)	Exón 9	12:47844974	C>T	TT	Tt	tt
<i>Apal</i> (rs7975232)	Intrón 8	12:47845054	A>C	AA	Aa	aa

C: citosina, T: timina, A: adenina, G: guanina.

*Gado et al., 2017; Mahto et al., 2018*

#### **VI.11.5.1 Estimación del desequilibrio de ligamiento, haplotipos y haplogenotipos de los polimorfismos en VDR**

- **Desequilibrio de ligamiento**

Entre diferentes polimorfismos localizados en el mismo cromosoma y relativamente próximos entre sí, suele observarse cierto grado de correlación o asociación estadística denominada desequilibrio de ligamiento (LD, del inglés *linkage disequilibrium*) (Iniesta *et al.*, 2005). El LD entre los polimorfismos *FokI*, *Apal*, *BsmI* y *TaqI* se expresó con el coeficiente corregido de Lewontin D (D') (Lewontin RC, 1964), el cual se estimó con el software SHEsis.

- **Haplotipos y haplogenotipos**

Las posibles frecuencias de los haplotipos de los alelos de los SNPs en VDR, se infirieron con el algoritmo de máxima verosimilitud de Excoffier y Slatkin (Excoffier & Slatkin, 1995) mediante el software SHEsis. Los haplogenotipos se identificaron por conteo directo de acuerdo con las combinaciones de haplotipos homocigotos que se presentaron.

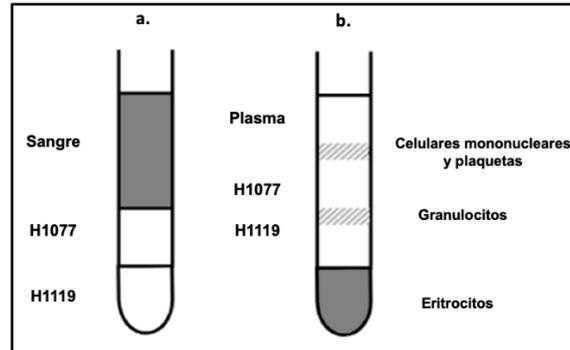
## VI.11.6 Cuantificación expresión mRNA de VDR

### VI.11.6.1 Extracción de mRNA de leucocitos totales

La extracción del RNA mensajero (mRNA del inglés *messenger Ribonucleic Acid*) se realizó mediante el uso de la técnica de Trizol de Chomczynsky y Sacchi (Chomczynski-Sacchi, 1987). Para la obtención de leucocitos totales se añadió en un tubo cónico con pipeta Pasteur estéril 3 mL del gradiente de densidad 1.119 g/mL (Histopaque® H1119) (Figura 9a), posteriormente se colocaron con una pipeta Pasteur estéril 3 mL del gradiente de densidad 1.077 g/mL (Lymphoprep™ H1077)(tocando parte de la pared del tubo que no se haya tocado con el anterior gradiente para evitar contaminar reactivos), una vez colocados los gradientes se procedió a añadir despacio y por las paredes 6 mL de sangre periférica fresca con anticoagulante EDTA, posteriormente se centrifugó el tubo a 800 g (1800rpm)/25 min, terminando la centrifugación el tubo se retiró de la centrifuga con cuidado para evitar que se rompiera el gradiente.

Se tomaron 10 alícuotas de 200 µL de la fracción de plasma (Figura 9b) (Para procedimientos posteriores que puedan requerir plasma). Con otra pipeta Pasteur estéril se tomó el primer anillo superior de células (mononucleares) y se colocaron en un tubo cónico nuevo y posteriormente se tomó el segundo anillo inferior formado (polimorfonucleares o granulocitos) y se colocaron en el mismo tubo cónico donde se colocó el primer anillo (con cuidado de no tomar la fracción de eritrocitos del tubo inicial). A continuación, se procedió a lavar la mezcla de los 2 anillos de leucocitos totales, primero se añadió buffer salino de fosfatos (PBS, del inglés *phosphate buffer saline*) hasta completar 11mL del tubo cónico y se homogenizó suavemente por inversión y después se centrifugó el tubo a 800g (1800 rpm)/10 min, una vez centrifugado se decantó el sobrenadante con un movimiento firme y suave conservando solo el botón precipitado formado al fondo del tubo. El botón de células se resuspendió con la pequeña parte de volumen de sobrenadante restante que permanece por tensión superficial en el tubo con pequeños golpes. Si el botón se visualizaba de color rojizo debía realizarse un segundo lavado colocando PBS hasta

11 mL, posteriormente se homogenizó por inversión, se centrifugó a 800 g (1800 rpm) /10 min y se decantó el sobrenadante nuevamente.



**Figura 9. Separación por gradientes de linfocitos totales.**

H1077: Gradiente de densidad 1.077 g/mL para células mononucleares de sangre periférica; H119: Gradiente de densidad 1.119 g/mL para células polimorfonucleares.

Una vez obtenidos los leucocitos totales se agregaron al tubo 100  $\mu$ L del reactivo TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen Life Technologies, USA) y se homogenizó por resuspensión con la micropipeta hasta observar una suspensión homogénea, posteriormente se dejaron reposar por 5 min y por resuspensión suave se homogenizó el precipitado del fondo del tubo cónico. Se agregaron 40  $\mu$ L de cloroformo, la muestra se homogenizó y se dejó reposar por 5 min. Se centrifugó a 10,000 rpm por 18 min a 4° C y se recuperó la fase acuosa con 100  $\mu$ L de isopropanol, una vez recuperado el mRNA, éste se rehidrató con 10  $\mu$ L de agua con dietilpirocarbonato como inhibidor de las RNAsas. Por último, se cuantificó la concentración del mRNA obtenido y las muestras se almacenaron a -80° C.

### **VI.11.7 Cuantificación de la expresión del mRNA de *VDR*, *FOXP3* y *RORc* en leucocitos totales**

Se cuantificaron los niveles de expresión del mRNA del receptor de *VDR*, *FOXP3* y *RORc* por la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR del inglés, *quantitative polymerase chain reaction*) de dos pasos con sondas de hidrólisis

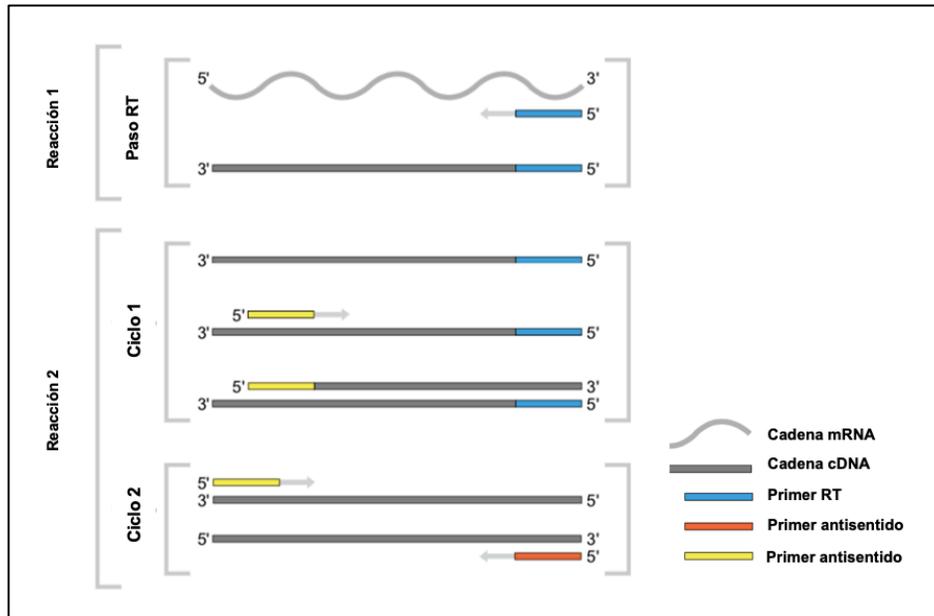
específicas e iniciadores diseñados por medio de la plataforma *ThermoFisher Scientific* basados en la química de las sondas *TaqMan*®.

#### **VI.11.7.1 Transcripción inversa**

En un tubo de 0.2 µL se agregaron 1 µL de Oligo dT y 1 µg de mRNA, el tubo se aforó a un volumen final de 15 µL con agua dietilpirocarbonato (DEPC) desionizada libre de RNAsas y se incubaron a 70° C durante 5 minutos. Posteriormente, la muestra se colocó en hielo para después agregar: 5 µL del buffer de reacción 5x, 1.25 µL de dNTPs (10 mM), 0.25 µL del inhibidor de la RNasa (400 U/µL) y la enzima *M-MLV* para aforar a un volumen final de 25 µL e incubar a 42 °C por 60 minutos. Por último se agregaron 0.5 µL de la ribonucleasa H (1.5 U/µL) y la muestra se incubó por 20 minutos a 37° C para finalmente almacenar el DNA complementario obtenido a -80° C.

#### **Fundamento de la técnica:**

En la técnica de dos pasos la transcripción inversa y la amplificación se realizaron en dos reacciones separadas, una reacción para la generación de la cadena complementaria de ADN de acuerdo al protocolo que se mencionaba en la sección IV.4.2 Transcripción inversa y un segundo que constó de una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) con un par de primer específicos para la cadena de ADN complementario y una sonda complementaria basada en la química de las sondas *TaqMan*® (Figura 10).



**Figura 10. Fundamento cuantificación expresión mRNA con técnica de sondas TaqMan®.**

Imagen modificada de Thermofisher.

Para los genes *VDR*, *FOXP3* y *RORC* se utilizaron las sondas con las siguientes características:

Nombre del gen	TaqMan Assay ID
<i>VDR</i>	Hs00172113_m1
<i>FOXP3</i>	Hs00203958_m1
<i>RORC</i>	Hs01076122_m1

Como gen de referencia (expresión constitutiva) se utilizó la sonda *GAPDH* (del inglés *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*; Hs9999905\_m1) de Applied Biosystems.

### VI.11.8 Cuantificación de citocinas Th17 y Treg

La cuantificación de las citocinas de los perfiles Th17 y Treg se realizó mediante el uso de la técnica ELISA indirecta en sándwich.

#### Fundamento de la técnica:

Este ensayo se basó en la técnica cuantitativa de inmunoensayo enzimático (ELISA) en sándwich. La microplaca estaba recubierta con un anticuerpo específico para la citocina de interés. Los estándares y las muestras se pipetearon en los pocillos. Las muestras se incubaron y el analito de interés presente en las muestras se unió al anticuerpo previamente fijo en la placa. Posteriormente se descartó el sobrenadante para eliminar cualquier sustancia no unida, después se agregó un anticuerpo conjugado con biotina específico para otro epítipo del analito de interés a los pocillos y se dejó incubar. A continuación, se realizó un lavado y se agregó peroxidasa de rábano conjugada con avidina (HRP) a los pocillos. Por último, se realizó un lavado para eliminar cualquier residuo de avidina-HRP no unido y se agregó una solución de sustrato (TMB) a los pocillos. La intensidad del color fue proporcional a la cantidad de analito unido en el paso inicial. La reacción colorimétrica se detuvo y se midió la intensidad del color a 450 nm dentro de los siguientes 5 min (Figura 11).

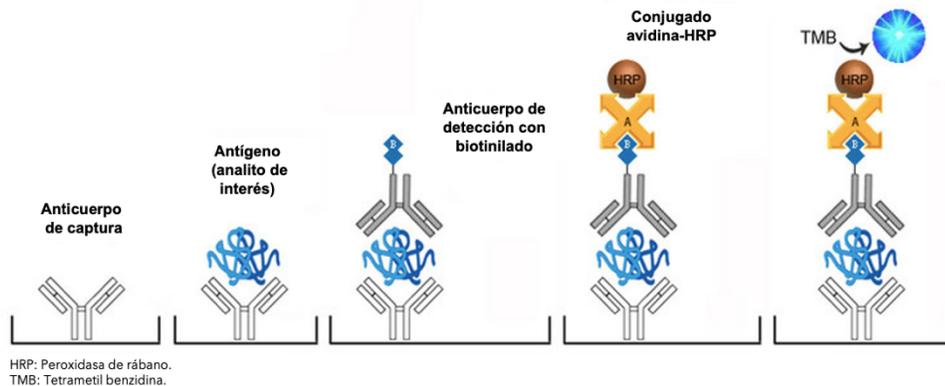


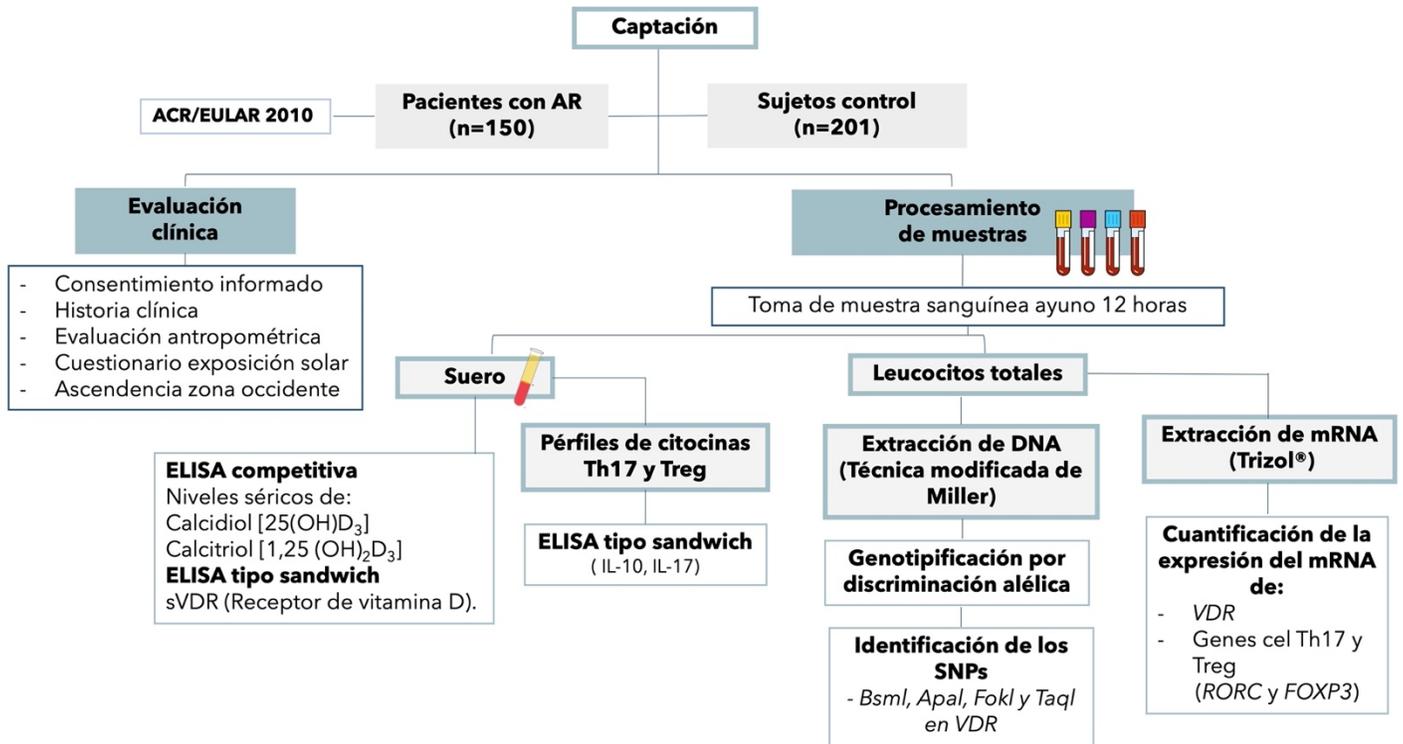
Figura 11. Fundamento de la técnica ELISA indirecta tipo sandwich.

## VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con los softwares STATA v14, y GraphPad Prism v8. Para el análisis descriptivo, las variables discontinuas nominales se expresaron como frecuencias y porcentajes, las variables continuas con distribución paramétrica se expresaron como medias  $\pm$  desviación estándar (DS) y las variables no paramétricas se expresaron como medianas y percentiles 5-95. Para el análisis inferencial, se utilizó la prueba de  $\chi^2$  para la comparación de proporciones. Para determinaciones cuantitativas paramétricas de dos grupos se utilizó la prueba de *t* de Student y para más de dos grupos la prueba de ANOVA. La prueba U de Mann-Whitney se utilizó para las determinaciones cuantitativas no paramétricas de dos grupos y para más de dos grupos la prueba de Kruskal-Wallis. Se consideraron diferencias significativas con un valor de  $p < 0.05$ . La expresión relativa del mRNA de *VDR* se calculó usando los métodos:  $2^{-\Delta Cq}$  y el método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  para la comparación por grupos después de validar la eficiencia de las reacciones de los genes de interés y del gen GAPDH utilizado como gen de referencia.

Las diferencias se consideraron como significativas con un valor de  $p < 0.05$ .

## VIII. DIAGRAMA DE TRABAJO



## IX. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	SEMESTRE							
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°
Revisión bibliográfica								
Escritura protocolo								
Captación de muestra								
Procesamiento de muestras y genotipificación								
Extracción RNA y cuantificación de la expresión del mRNA de VDR								
ELISA competitiva/sandwich Calcidiol [25(OH)D <sub>3</sub> ] Calcitriol [1,25 (OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> ] VDR sérico								
ELISA tipo sandwich (Cuantificación citocinas Treg y Th17)								
Análisis de datos								
Escritura de artículo								
Escritura tesis								

## X. RESULTADOS

Se captaron en total 148 pacientes con AR y 201 participantes SC. Respecto a las características sociodemográficas de ambos grupos de estudio las pacientes con AR tenían mayor edad, peso, IMC e ICC vs. las SC (Edad: AR= 48 (27 – 65) vs. SC= 34 (19 - 59),  $p<0.001$ ; peso (Kg): AR= 67.4 (48.59 – 93.4) vs. SC= 62.5 (47.7 - 86.7),  $p<0.01$ ; IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ): AR= 27.42 (20.09 – 36.58) vs. SC= 24.06 (18.7 – 34.89); ICC: AR= 0.84 (0.74 – 0.98) vs. SC= 0.8 (0.68 – 0.93)(Cuadro 12).

**Cuadro 12. Características sociodemográficas y antropométricas de ambos pacientes con AR y SC.**

Variable	AR (n=148 )	SC (n=201)	Valor de p*
<b>Características sociodemográficas</b>			
Edad (años) <sup>a</sup>	48 (27 – 65)	35 (19 – 59)	<b>&lt;0.001</b>
<b>Variables antropométricas</b>			
Talla (m) <sup>a</sup>	1.56 (1.48 – 1.66)	1.61 (1.50 – 1.70)	<b>&lt;0.001</b>
Peso (kg) <sup>a</sup>	67.4 (48.9 – 93.4)	62.5 (47.7 – 86.7)	<b>&lt;0.01</b>
IMC ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ) <sup>a</sup>	27.42 (20.09 – 36.58)	24.06 (18.7 – 34.89)	<b>&lt;0.001</b>
ICC <sup>a</sup>	0.84 (0.74 – 0.98)	0.8 (0.68 – 0.93)	<b>&lt;0.001</b>

HDL: Colesterol de alta densidad; LDL: Colesterol de baja densidad; IMC: Índice de masa corporal; ICC: índice cintura cadera; VSG: Velocidad de sedimentación globular; pCr: proteína C reactiva; Anti CCPs: Anticuerpos antipéptidos citrulinados; AINEs: Drogas antiinflamatorias no esteroideas. <sup>a</sup>Valores dados en mediana (p5-p95), *U-Mann Whitney*.

En el cuadro 13 se describen las características clínicas de las pacientes con AR. La mediana del tiempo de evolución de la enfermedad fue de 6.8 años y la mediana de la puntuación del índice de actividad clínica DAS28 fue de 3.07 interpretado como actividad leve de la enfermedad.

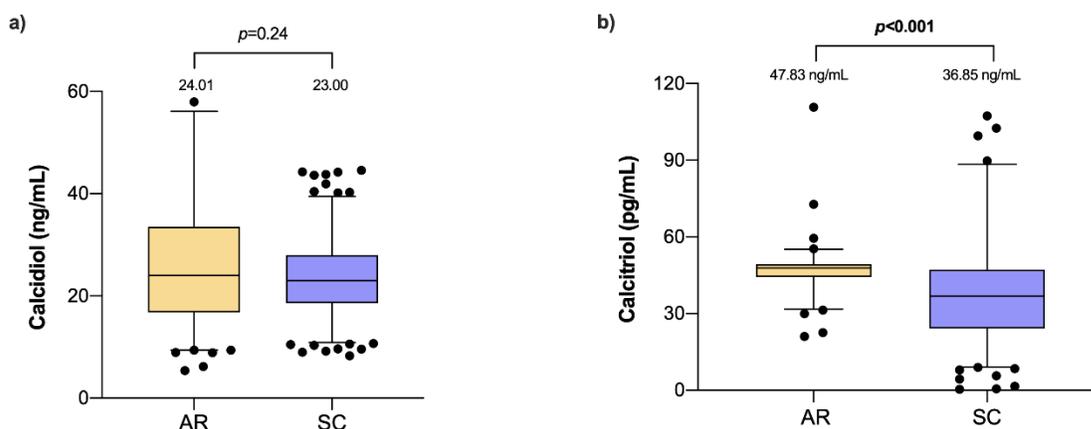
El 58% de las pacientes con AR eran tratadas con fármacos tipo AINES (antiinflamatorios no esteroideos), 17% con glucocorticoides, 4% con azatioprina, 35% con cloroquina, 87% con metotrexato y el 70% con sulfasalazina.

**Cuadro 13. Características clínicas de los pacientes con AR y SC.**

<i>Variable</i>	<b>AR (n= 148)</b>	<b>SC (n=201)</b>	<i>Valor de p</i>
<b>Estado de la enfermedad</b>			
Tiempo de evolución (años) <sup>b</sup>	6.8 (1 – 22)	-	-
AR temprana (< de 1 año)	1 (0.3 – 1)	-	-
AR establecida (> de 1 año)	8 (2 - 22)	-	-
<b>Evaluación clínica</b>			
VSG (mm/hora) <sup>b</sup>	35.5 (7.5 – 86)	-	-
Proteína C reactiva (mg/dL) <sup>b</sup>	4.4 (0.5 – 29.42)	-	-
Anti-CCPs (U/mL) <sup>a</sup>	243.88 ± 197.96	-	-
Factor reumatoide (UI/mL) <sup>b</sup>	114 (11 – 500)	-	-
DAS 28 <sup>b</sup>	3.07 (1.46 – 5.85)	-	-
Articulaciones inflamadas <sup>b</sup>	0 (0 – 10)	-	-
Articulaciones dolorosas <sup>b</sup>	1 (0 – 8)	-	-
Hemoglobina (g/dL) <sup>b</sup>	13.22 (9.03- 15.33)	-	-
Hematocrito (%)	40.41 (28.85 – 45.55)	-	-
Eritrocitos (millon/mL) <sup>a</sup>	4.41(3.8 – 5.21)	-	-
Leucocitos (miles/mL) <sup>b</sup>	6.95 (4.35 -12)	-	-
Plaquetas (miles/mL) <sup>b</sup>	275.25 (179 – 393.7)	-	-
Linfocitos (cel/uL) <sup>b</sup>	1.98 (0.914 – 3.36)	-	-
Glucosa (mg/dL) <sup>b</sup>	88 (75 – 127)	88.44 (75.14 – 114.23)	0.17
<b>Albúmina (g/dL)<sup>b</sup></b>	<b>3.91 (3.25 – 4.48)</b>	<b>3.81 (3.39 – 4.42)</b>	<b>0.02</b>
<b>Triglicéridos (mg/dL)<sup>b</sup></b>	<b>98.48 (50.99 – 195)</b>	<b>76.63 (39.41 – 198.72)</b>	<b>&lt;0.001</b>
Colesterol (mg/dL) <sup>b</sup>	172 (121-237)	174.46 (125.25 – 243.82)	0.34
LDL (mg/dL) <sup>b</sup>	95.42 (55.37 – 147.14)	95.23 (61.61 – 157.25)	0.30
HDL (mg/dL) <sup>b</sup>	49.62 (30.47 – 76.24)	51.34 (35.28 – 75.93)	0.11
<b>Tratamiento %(n)</b>			
AINEs	58 % (78/133)	-	-
Glucocorticoides	17 % (23/133)	-	-
Azatriopina	4 % (6/133)	-	-
Metotrexate	87 % (117/133)	-	-
Cloroquina	35% (47/133)	-	-
Sulfasalazina	70% (88/133)	-	-

HDL: Colesterol de alta densidad; LDL: Colesterol de baja densidad; IMC: Índice de masa corporal; ICC: índice cintura cadera; VSG: Volumen de sedimentación globular; pCr: proteína C reactiva; Anti CCPs: Anticuerpos antipéptidos citrulinados; AINEs: Drogas antiinflamatorias no esteroideas. <sup>a</sup>: Valores dados en media ± SD, \*prueba T de student. <sup>b</sup>: Valores dados en mediana (p5-p95),\*U-Mann Whitney.

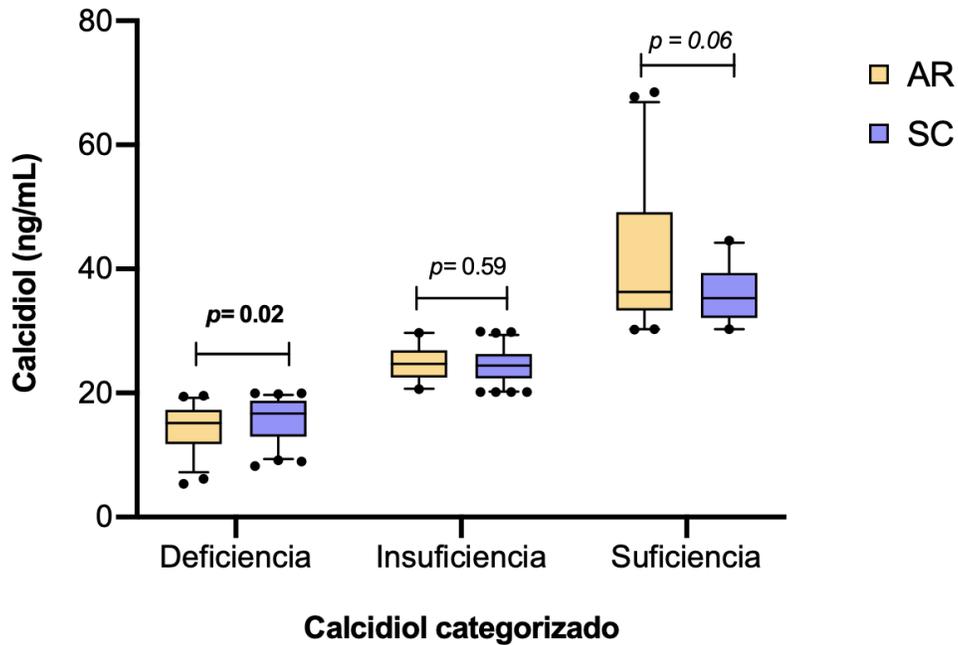
Se cuantificaron los niveles séricos de calcidiol (ng/mL) y calcitriol (pg/mL) en AR y SC (Figura 13). La mediana de la concentración de calcidiol sérico en el grupo de AR fue de 24.01 (9.41 – 53.87) ng/mL vs. 23.00 (10.91 – 39.36) ng/mL en SC (Figura 13a). Los niveles séricos de calcitriol (pg/mL) fueron mayores en AR vs. SC (47.83 (12.92 – 72.75) pg/mL vs. 36.85 (9.64 – 82.58) pg/mL;  $p < 0.001$ ) (Figura 13b) respectivamente.



**Figura 12. Comparación de los niveles séricos de calcidiol y calcitriol en pacientes con AR y SC.**

Datos proporcionados en mediana (p5 - p95). Prueba *U de Mann Whitney*.

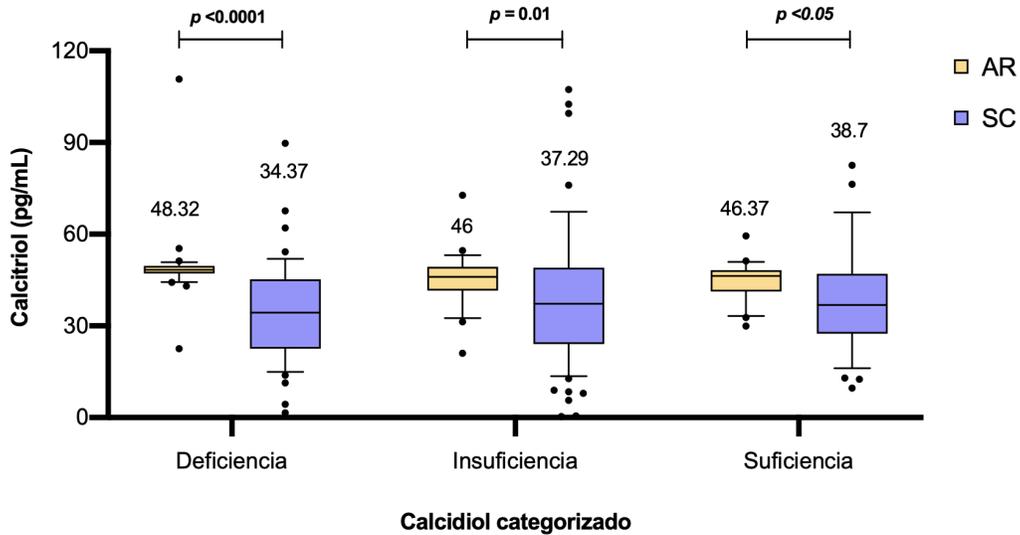
Se analizaron los niveles séricos de calcidiol (ng/mL) conforme a la clasificación de la suficiencia sérica de vitamina D en ambos grupos de estudio (Figura 14). El 37% de pacientes con AR presentó deficiencia de calcidiol, el 30% insuficiencia y el 33% niveles suficientes de calcidiol, en los SC la frecuencia fue de 36% para la deficiencia, 44% insuficiencia y 20% suficiencia ( $p < 0.01$ ). Así mismo, observamos que los niveles séricos de calcidiol eran menores en las pacientes con AR con deficiencia comparadas con las SC (16.73 (9.58 – 19.55) ng/mL vs. 15.14 (8.88 – 19.93) ng/mL;  $p = 0.02$ ) (Figura 14).



**Figura 13. Comparación de los niveles séricos de calcidiol estratificados por calcidiol categorizado en pacientes con AR y SC.**

\*Datos proporcionados en mediana (p10 – p90). \*Prueba U de Mann Whitney.

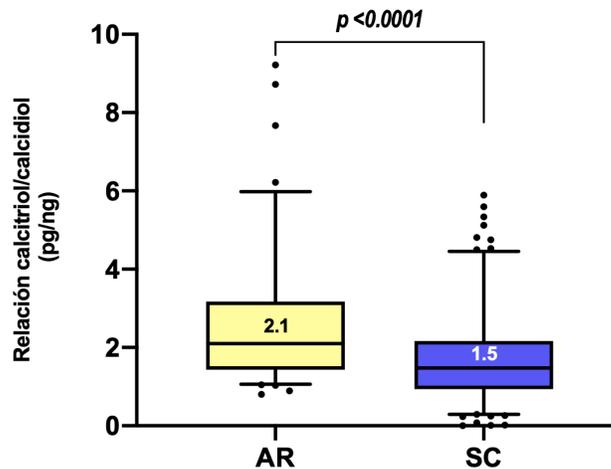
Además, se observó una diferencia significativa en los niveles séricos de calcitriol categorizados por suficiencia de calcidiol siendo mayores en las pacientes con AR vs. SC con deficiencia 48.32 (43.06 – 55.31) pg/mL vs. 34.37 (11.36 - 62.02) pg/mL,  $p < 0.0001$ ), seguido de las que presentaron insuficiencia 46 (31.32 – 54.63) pg/mL vs. (37.29 (-) pg/mL,  $p = 0.01$ ) y por último el grupo con suficiencia 46.37 (32.75 – 51.29) pg/mL vs. 38.7 (12.5 – 132.7) pg/mL,  $p < 0.05$ ) (Figura 15).



**Figura 14. Niveles séricos de calcitriol estratificados por calcidiol categorizado en pacientes con AR y SC.**

Datos proporcionados en mediana (p10 - p90). Prueba *U* de Mann Whitney.

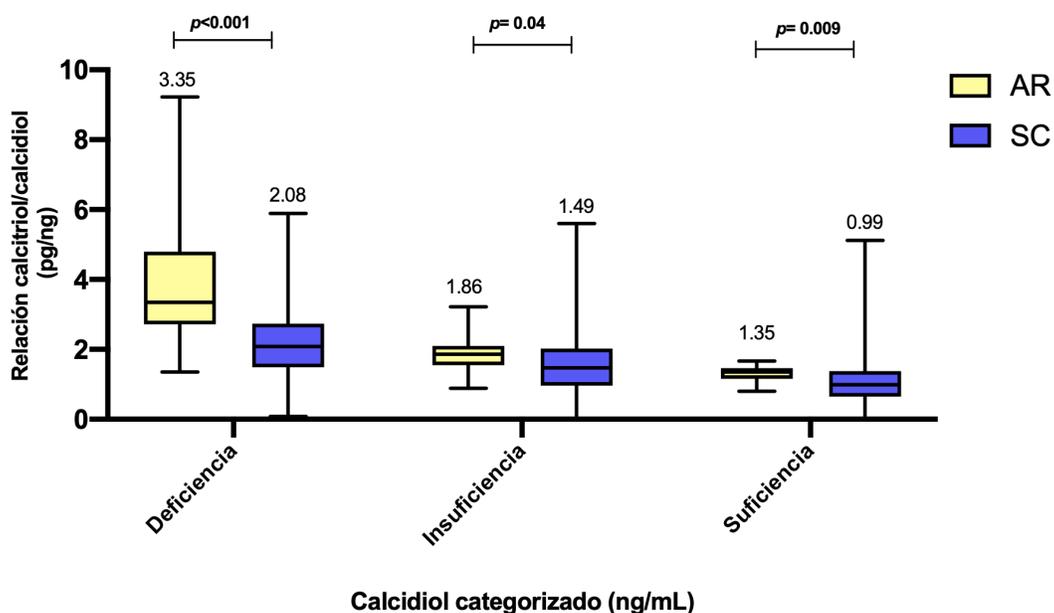
Así mismo, se analizó la eficiencia de hidroxilación de la vitamina D con la relación calcitriol/calcidiol (pg/ng) en ambos grupos. Las pacientes con AR presentaron una relación de hidroxilación más elevada en comparación con los SC (2.1 (1.05 – 5.42) vs. 1.5 (0.3 – 4.5) pg/ng) (Figura 16).



**Figura 15. Análisis de la relación calcitriol/calcidiol en pacientes con AR y SC.**

Datos proporcionados en mediana (p10-p90). Prueba *U* de Mann Whitney.

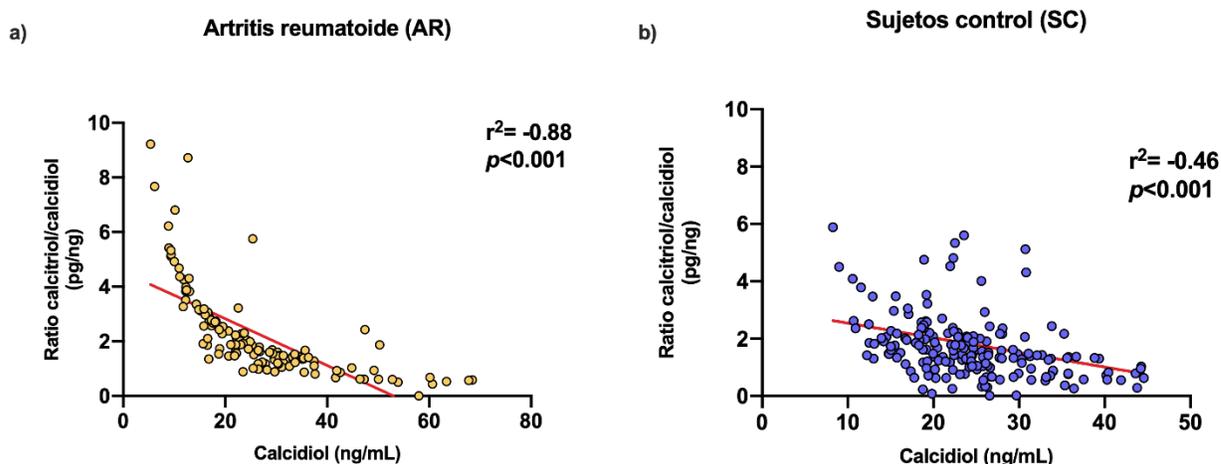
Además, se observó que las pacientes con deficiencia de calcidiol presentaban mayor hidroxilación de vitamina D en comparación con las SC 3.35 (2.28 – 8.72) vs. 2.08 (0.64 – 4.5) pg/ng), seguido del grupo con insuficiencia 1.86 (1.18 – 2.38) vs. 1.49 (0.3 – 4.81) pg/ng) y por último las pacientes con suficiencia (1.35 (1.03 – 1.6) vs. 0.99 (0.26 – 4.31) pg/ng) respectivamente (Figura 17).



**Figura 16. Análisis de la relación calcitriol/calcidiol estratificada por calcidiol categorizado en pacientes con AR y SC.**

Datos proporcionados en mediana (p10 – p90). Prueba *U de Mann Whitney*.

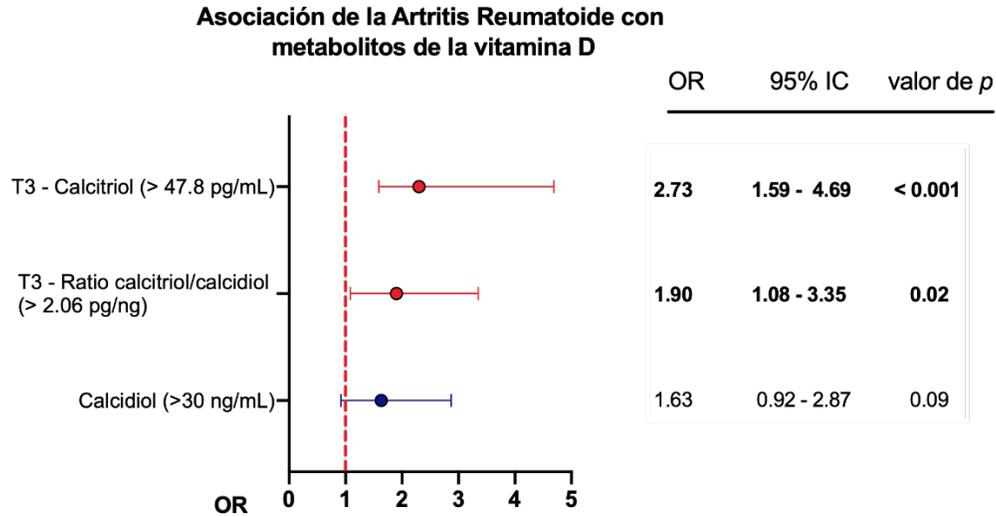
De acuerdo al resultado anterior inferimos que conforme se alcanzaba la suficiencia de calcidiol (>30 ng/mL) la hidroxilación de calcidiol disminuía. Para comprobar lo anterior, se hicieron análisis de correlación entre los niveles séricos de calcidiol con la relación calcitriol/calcidiol en ambos grupos de estudio. Observamos una correlación negativa en ambos grupos. Sin embargo, fue más fuerte en las pacientes con AR (AR:  $r=-0.88$ ;  $p<0.001$  y SC:  $r= -0.46$ ;  $p<0.001$ ) (Figura 18).



**Figura 17. Correlación de los niveles séricos de calcidiol con la relación calcitriol/calcidiol en pacientes con artritis reumatoide (AR) y sujetos control (SC).**

a). Correlación de los niveles séricos de calcidiol (ng/mL) con la relación calcitriol/calcidiol (pg/ng) en pacientes con AR. b). Correlación de los niveles séricos de calcidiol (ng/mL) con la relación calcitriol/calcidiol (pg/ng) en SC. Prueba de correlación de Spearman.

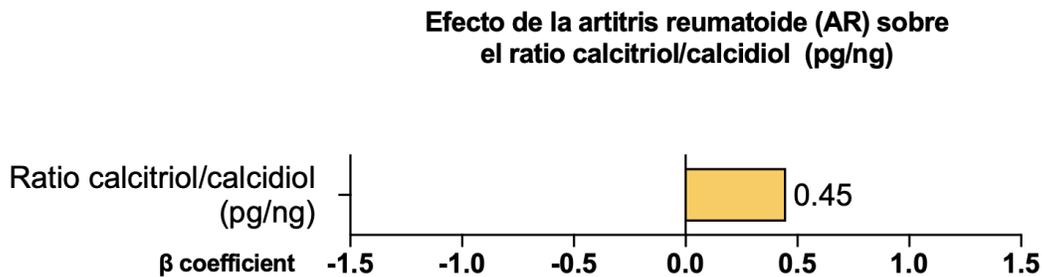
Considerando los resultados previos hicimos análisis de regresión logística para evaluar la asociación entre la AR con los metabolitos de la vitamina D (Figura 19). Donde observamos que las pacientes con AR presentaron riesgo mayor para hidroxilar más calcidiol (OR: 1.90 (1.08 – 3.35);  $p=0.2$ ) y para tener niveles altos de calcitriol que las SC (OR: 2.73 (1.59 – 4.69);  $p < 0.001$ )(Figura 19).



**Figura 18. Asociación de la Artritis Reumatoide (AR) con los metabolitos de la vitamina D.**

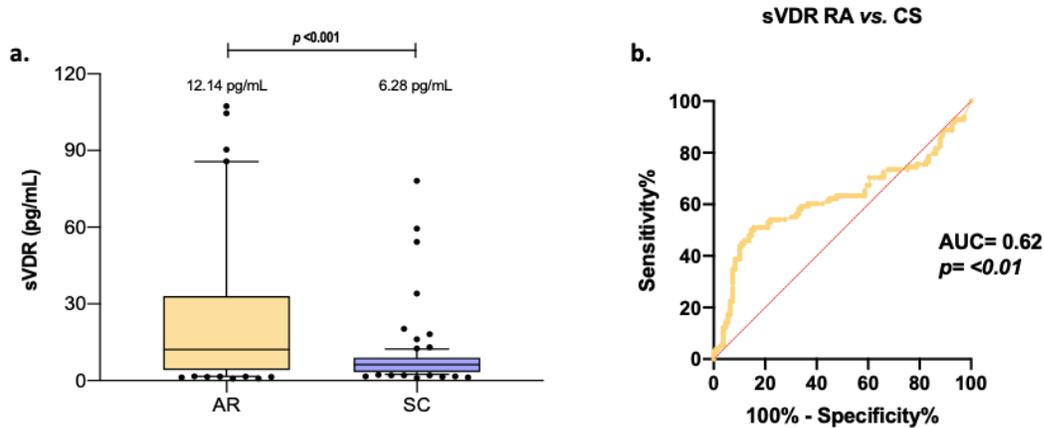
T3: Tércil 3. OR: odds ratio; IC: Intervalos de confianza 95%, valor de  $p < 0.05$ . Grupo de referencia: pacientes AR con calcidiol  $< 20$  ng/mL; ratio calcitriol/calcidiol  $\leq 1.30$  pg/ng and calcitriol  $\leq 37.22$  pg/mL.

Por último, de acuerdo con un análisis de regresión logística múltiple (coeficiente  $\beta$ ) observamos que tener AR aumenta 0.45 pg/ng la eficiencia de hidroxilación de calcidiol a calcitriol (Figura 20).



**Figura 19. Efecto de la artritis reumatoide (AR) sobre el ratio calcitriol/calcidiol (pg/ng).**  
 $\beta$  coefficient.

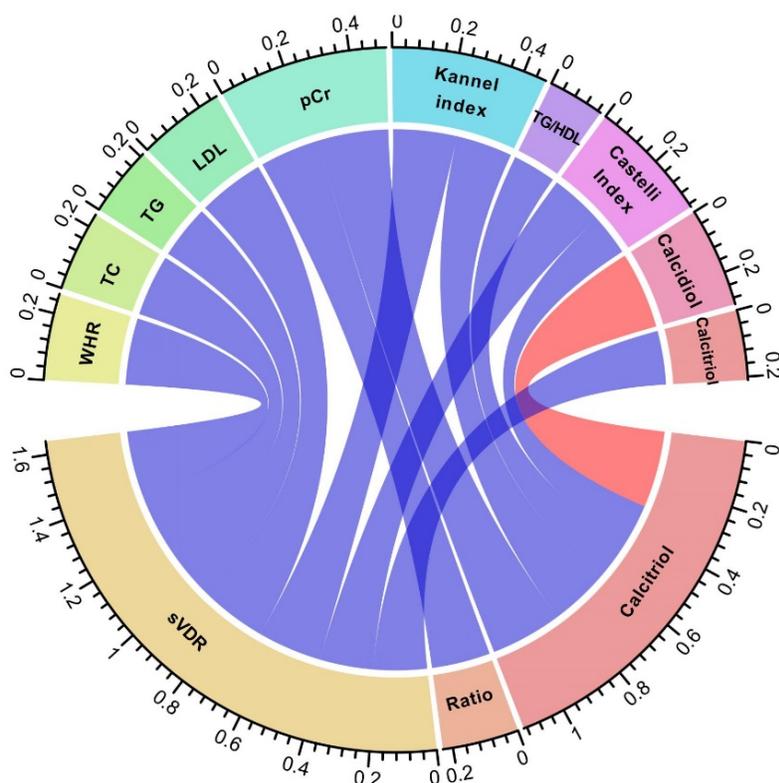
Respecto a los niveles de sVDR observamos que niveles mayores en las pacientes con AR vs. SC (AR: 12.14 (1.47 – 120.9) pg/mL vs. SC: 6.28 (1.68 – 23.04) pg/mL,  $p < 0.001$ ) (Figura 21).



**Figura 20. Comparación de los niveles solubles del sVDR en pacientes con AR vs. SC y capacidad discriminatoria (curva ROC) de sVDR entre pacientes AR y SC.**

Niveles de sVDR (pg/mL) en pacientes artritis reumatoide (AR) vs. sujetos control (SC). Datos presentados en mediana (p10 – p90). Prueba U de Mann Whitney. b. Capacidad discriminatoria (curva ROC) de sVDR entre pacientes con AR y sujetos control (SC).

Además, realizamos análisis de correlación entre los niveles séricos de calcitriol, la relación calcitriol/calcediol y sVDR, con las variables antropométricas, bioquímicas y clínicas en ambos grupos (Figura 22). Donde observamos que sVDR y calcitriol ( $r=0.21$ ;  $p=0.03$ ) correlacionaron positivamente, así como, la relación de hidroxilación calcitriol/calcediol ( $r=0.23$ ;  $p=0.01$ ) y el calcitriol ( $r=0.23$ ;  $p=0.01$ ) correlacionaron positivamente con la pCr en pacientes con AR (Figura 22).



**Figura 21. Correlograma de los metabolitos de la vitamina D (sVDR, ratio calcitriol/calcidiol y calcitriol) con variables antropométricas, bioquímicas y pCr en pacientes con artritis reumatoide (AR).**

Coeficientes de correlación Spearman están representados como líneas conectoras entre las variables antropométricas, bioquímicas y pCr (arcoiris) con los niveles de sVDR (amarillo), ratio calcitriol/calcidiol (naranja) y calcitriol (rojo claro). Solo se muestran correlaciones con valor de  $p < 0.05$ . Líneas rojas= representan correlación negativa y líneas azules= correlación positiva. El ancho de las líneas representa el valor del coeficiente de correlación ( $r$ ). Para todas las correlaciones ver el cuadro suplementario 5. WHR: índice cintura cadera del inglés *Waist hip ratio*; TG: Triglicéridos del inglés; *Triglycerides*; TC: Colesterol total del inglés *Total cholesterol*; LDL-C: Colesterol de baja densidad del inglés *Low-density lipoprotein cholesterol*; CRP: Proteína C reactiva del inglés *C reactive protein*; TG/HDL: índice triglicéridos/HDL del inglés *triglycerides/HDL-C index*.

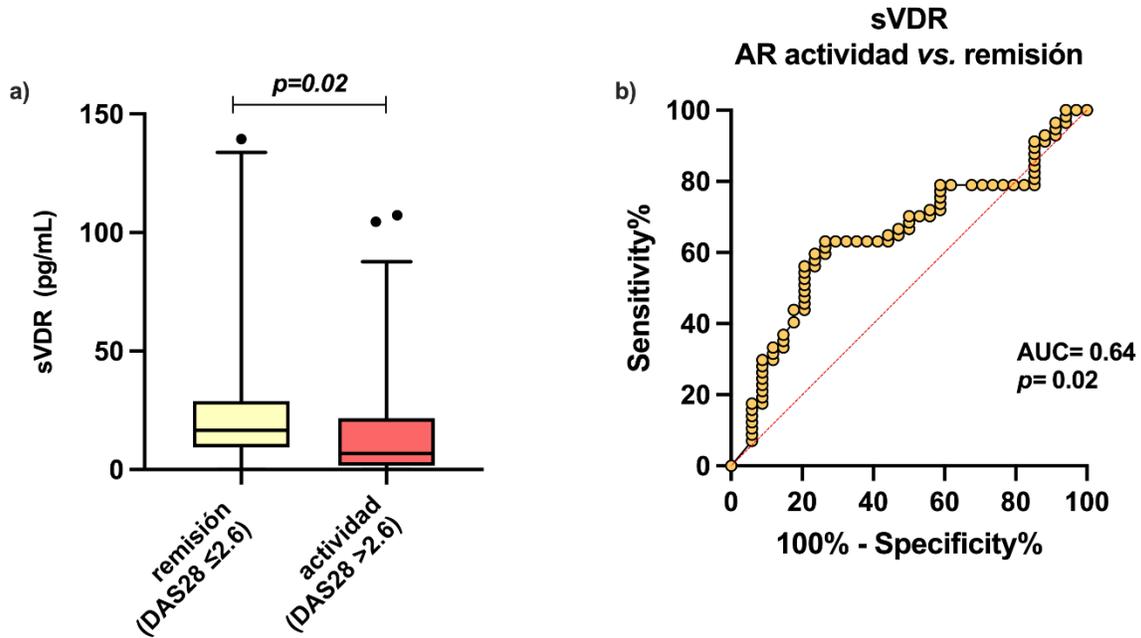
Se estratificaron las variables antropométricas, bioquímicas, clínicas y los metabolitos de la vitamina D de acuerdo con la actividad de la enfermedad (DAS 28, actividad  $> 2.6$ , remisión  $< 2.6$ ) en los pacientes con AR (Cuadro 15).

**Cuadro 14. Variables antropométricas, bioquímicas y clínicas estratificadas de acuerdo con la actividad de la enfermedad (DAS 28) en pacientes con AR.**

Variable	Remisión (DAS 28 < 2.6) n=50	Actividad (DAS28 ≥ 2.6) n=86	Valor de p*
<b>Variables antropométricas</b>			
Talla (cm) <sup>a</sup>	156.0 (148 -164)	156 (148 -166)	0.30
Peso (kg) <sup>a</sup>	66.5 (48.9 – 93.1)	67.9 (49.4 – 97.2)	0.38
IMC(kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	27.22 (20.09 -35.05)	27.62 (20.99 – 36.7)	0.77
ICC <sup>a</sup>	0.85 (0.74 – 0.94)	0.84 (0.74 – 0.99)	0.99
<b>Variables bioquímicas</b>			
Glucosa (mg/dL) <sup>a</sup>	89.03 (72.38 – 125.36)	87 (75 -127)	0.57
Triglicéridos (mg/dL) <sup>a</sup>	93.38 (44.65 – 161.22)	103.155 (53.34 – 210)	0.16
Colesterol (mg/dL) <sup>a</sup>	165.34 (119.2 – 217.5)	173 (114 – 247)	0.56
HDL (mg/dL) <sup>a</sup>	46.6 (28.99 – 71.93)	50.14 (33.07 – 76.24)	0.11
LDL (mg/dL) <sup>a</sup>	93.3 (57 – 136.34)	96.98 (55.42 – 163.59)	0.67
Índ. aterogénico <sup>a</sup>	3.45 (2.4 – 5.66)	3.44 (2.3 – 4.93)	0.34
Albúmina(g/dL) <sup>a</sup>	3.94 (3.44– 4.63)	3.91 (3.21 – 4.49)	0.79
<b>Metabolitos de la vitamina D</b>			
Calcidiol (ng/mL) <sup>a</sup>	24.01 (9.41 – 47.4)	24.22 (9.35 – 57.96)	0.98
Calcitriol (pg/mL) <sup>a</sup>	45 (22.56 – 54.63)	44.27 (26.22 – 59.46)	0.88
sVDR (pg/mL) <sup>a</sup>	<b>28.22 (0.02 – 133.9)</b>	<b>19.84 (0.03 – 87.64)</b>	<b>0.01</b>
<b>Variables clínicas</b>			
Tiempo de evolución (años) <sup>a</sup>	8 (1.5 - 22)	5.5 (1 - 22)	0.14
VSG (mm/hora) <sup>a</sup>	31 (7 - 77)	41 (10 - 102)	0.23
pCr (mg/dL) <sup>a</sup>	3.7 ( 0.6 – 21.86)	5 (0.4 – 33.79)	0.11
Factor reumatoide (UI/mL) <sup>a</sup>	114 (8 – 184)	118 (11 – 613)	0.66
Anti-CCPs (U/mL) <sup>b</sup>	200.67 ± 203.49	234.05 ± 200.61	0.35

HDL: Colesterol de alta densidad; LDL: Colesterol de baja densidad; IMC: índice de masa corporal; ICC: índice cintura cadera; VSG: Volúmen de sedimentación globular; pCr: proteína C reactiva; Anti CCPs: Anticuerpos antipeptidos citrulinados. <sup>a</sup>: Valores dados en mediana (p5-p95),\*U-Mann Whitney. <sup>b</sup>: Valores dados en media ± SD, \*prueba T de student.

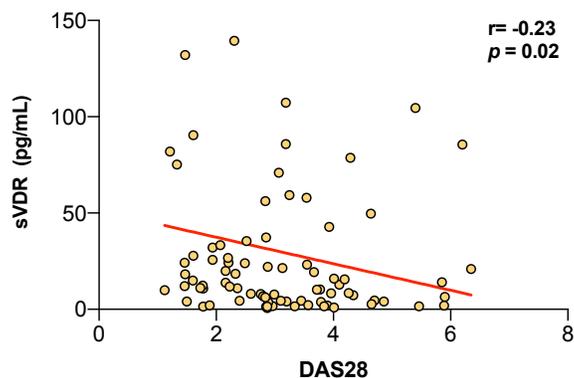
Se observó diferencia en los valores de sVDR que fueron mayores en las pacientes AR con remisión vs. aquellas con actividad clínica de la enfermedad (remisión: 28.22 (0.02 – 347) pg/mL vs. actividad: 7.01 (0.03 – 104.6) pg/mL;  $p=0.02$ )(Figura 23).



**Figura 22. Niveles de sVDR estratificados por actividad de la enfermedad (DAS28) y capacidad discriminadora de sVDR entre pacientes AR con actividad y remisión de la enfermedad..**

a. Niveles de sVDR (pg/mL) en pacientes artritis reumatoide (AR) con remisión de la enfermedad (DAS 28 <2.6) y pacientes con actividad de la enfermedad (DAS 28 ≥ 2.6). Datos presentados en mediana (p10 – p90). Prueba U de Mann Whitney. b. Capacidad discriminadora (curva ROC) de sVDR entre pacientes AR remisión y con actividad.

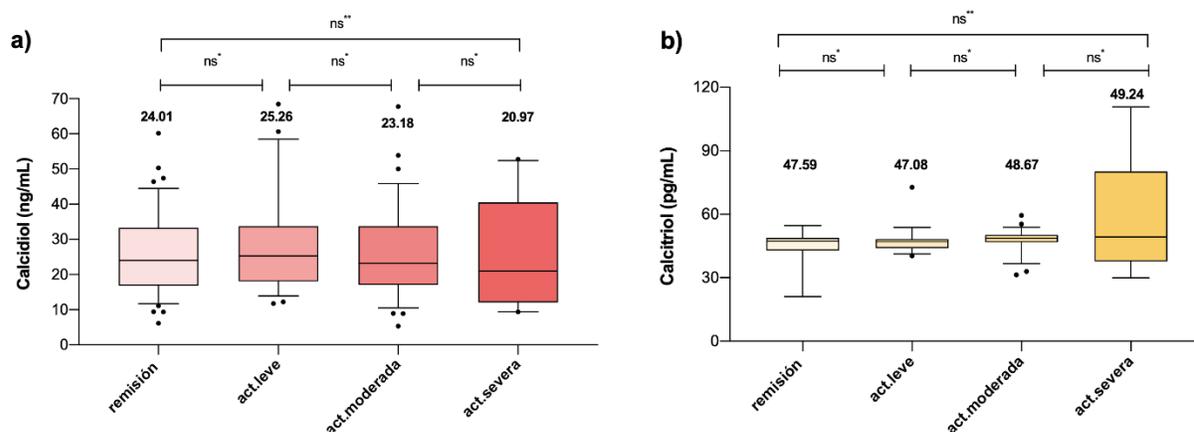
Por lo tanto, se realizó un análisis de asociación entre la actividad clínica de la enfermedad (DAS 28) con sVDR en las pacientes con AR donde se observó una correlación negativa entre las variables ( $r = -0.23$ ,  $p = 0.02$ ). Es decir, conforme aumenta la actividad de la enfermedad los niveles de sVDR disminuyen (Figura 24).



**Figura 23. Análisis de correlación entre la actividad clínica de la enfermedad (DAS 28) y sVDR en pacientes con artritis reumatoide (AR).**

Prueba de correlación de Spearman.

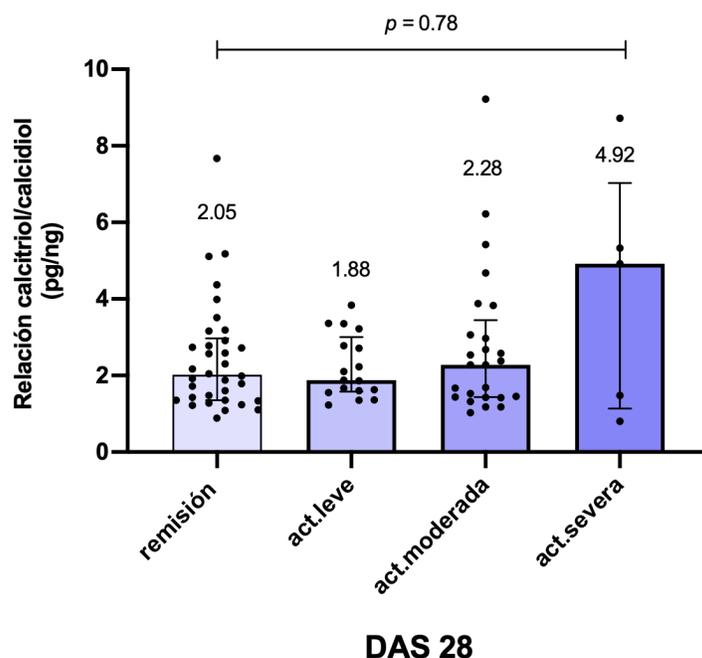
Posteriormente, se analizaron los niveles de calcidiol (ng/mL) y calcitriol (pg/mL) estratificados por las cuatro categorías del DAS28 (remisión, actividad leve, actividad moderada, actividad severa). No se observaron diferencias significativas en los niveles de ambos metabolitos de acuerdo con la actividad clínica de la enfermedad (Figura 25).



**Figura 24. Niveles séricos de calcidiol y calcitriol estratificados por actividad clínica de la enfermedad en pacientes con AR.**

\*\* Datos proporcionados en mediana (p5 - p95).\*\*Prueba *Kruskall Wallis*. \* Prueba post hoc *Dunns*.

También se analizó la relación calcitriol/calcidiol por actividad clínica de la enfermedad (DAS28). No se observó diferencia en la eficiencia de hidroxilación del calcidiol entre las cuatro categorías del DAS28 (remisión, actividad leve, actividad moderada y actividad severa) (Figura 26).



**Figura 25. Relación calcitriol/calcidiol categorizada por actividad clínica de la enfermedad (DAS28) en pacientes con artritis reumatoide (AR)**

Datos proporcionados en mediana y rangos intercuartiles (p25 – p75).\*Prueba *Kruskall Wallis*.

Se categorizaron las variables antropométricas, bioquímicas y metabolitos de la vitamina D por terciles de sVDR (T1: 0.72 – 4.67 pg/mL, T2: 4.68 – 11.7 pg/mL y T3: 11.71 – 367 pg/mL) en ambos grupos de estudio (Cuadro 16 y Cuadro 17). En el caso de los SC se observó que aquellos ubicados en el T1 de sVDR poseen mayor peso (kg), IMC (kg/m<sup>2</sup>), cintura (cm), cadera (cm) e ICC en comparación con aquellos ubicados en el T2 y T3 (p< 0.05). En cuanto a las variables bioquímicas los SC ubicados en el T2 de sVDR tienen niveles más elevados de albúmina en

comparación con los ubicados en el T1 y T3 de sVDR T2: 3.89 (3.51 – 4.42) g/dL vs. T1: 3.67 (3.47 – 4.21) g/dL y T3: 3.76 (3.51 – 4.21) g/dL,  $p= 0.003$ ). Por otra parte, los niveles séricos de triglicéridos se presentaron más elevados en los SC ubicados en el T1 de sVDR en comparación con los ubicados en el T2 y T3 (T1: 74.76 (36 – 145.3) mg/dL vs. T2: 64.11 (37.02 – 130.63) mg/dL y T3: 53.23 (39.41 – 118.75) mg/dL,  $p=0.02$ )(Cuadro 16).

**Cuadro 15. Variables antropométricas y niveles séricos de variables bioquímicas y metabolitos de la vitamina D estratificados por terciles de sVDR en sujetos control (SC).**

Sujetos control (SC).	sVDR (pg/mL)			Valor de p*
	T1: 0.72 – 4.67 (pg/mL) (n=45)	T2: 4.68 – 11.7 (pg/mL) (n=49)	T3: 11.71 – 367 (pg/mL) (n=16)	
<b>Antropométricas</b>				
Edad (años) <sup>a</sup>	31 (19 - 56)	23 (19 – 61)	22 (19 – 61)	0.01
Talla (cm) <sup>a</sup>	1.62 (1.54 – 1.72)	1.6 (1.53 – 1.71)	1.62 (1.53 – 1.76)	0.46
Peso (kg) <sup>a</sup>	64.15 (47.7 – 82.9)	55.4 (46.1 – 70.1)	59.05 (43.6 – 65.4)	0.01
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	23.6 (18.6 – 30.8)	22.1 (18.2 – 27.7)	22.1 (18.6 – 24.7)	0.01
Cintura (cm) <sup>a</sup>	76.3 (62.5 – 100.1)	71 (62– 88.5)	69.3 (61.3 – 79)	0.008
Cadera (cm) <sup>a</sup>	101 (88.5 – 116)	95 (85.5 – 104.7)	96 (86.4 – 102)	0.007
ICC <sup>a</sup>	0.77 (0.67 – 0.89)	0.74 (0.67 – 0.89)	0.71 (0.66 – 0.79)	0.049
<b>Bioquímicas</b>				
Glucosa (mg/dL) <sup>a</sup>	84.65 (75.2 – 103.1)	83.8 (72.9 – 100.7)	83.7 (76.8 – 113.9)	0.36
Albúmina (g/dL) <sup>a</sup>	3.67 (3.47 – 4.21)	3.89 (3.51 – 4.42)	3.76 (3.51 – 4.21)	0.003
Triglicéridos (mg/dL) <sup>a</sup>	74.76 (36 – 145.3)	64.11 (37.02 – 130.63)	53.23 (39.41 – 118.75)	0.02
Colesterol (mg/dL) <sup>a</sup>	165.41 (118.84 – 233.1)	157.29 (120.68 – 228.69)	158.06 (100.43 – 245.53)	0.38
HDL (mg/dL) <sup>b</sup>	50.32 (27.7 – 71.54)	54.5 (39.97 – 70.66)	54.09 (37.51 – 73.54)	0.26
LDL (mg/dL) <sup>a</sup>	94.91(59.14 – 147.27)	90.11 (58.57 – 157.98)	93.87 (49.57 – 170.58)	0.60
<b>Metabolitos de la vitamina D</b>				
Calcidiol (ng/mL) <sup>b</sup>	22.01 (12.24 – 40.44)	23.89 (15.48 – 40.28)	24 (14.51 – 44.57)	0.30
Calcitriol (pg/mL) <sup>a</sup>	33.32 (12.5 – 82.58)	40.04 (9.64 – 54.28)	38.3 (17.58 – 51.5)	0.48

HDL: Colesterol de alta densidad; LDL: Colesterol de baja densidad; IMC: índice de masa corporal; ICC: índice cintura cadera. <sup>a</sup>Datos expresados en mediana (p5-p95). <sup>b</sup>Prueba *Kruskall-Wallis*.

De forma similar se analizaron las variables antropométricas, bioquímicas, metabolitos de la vitamina D y variables clínicas de la enfermedad (AR) por terciles de sVDR (T1, T2 y T3) en pacientes con AR (Cuadro 17). Se observó que las

pacientes que se ubican en el T3 de sVDR tienen un índice cintura-cadera (ICC) mayor en comparación con aquellas ubicadas en el T1 y T2 (T3: 0.9 (0.7 – 0.9) vs. T1: 0.8 (0.7 – 0.9) y T2: 0.9 (0.7 – 1.01),  $p=0.03$ ). Así mismo se observó que las pacientes ubicadas en el T3 poseen niveles séricos más elevados de triglicéridos (T3: 110.27 (63.81 – 195) mg/dL vs. T1: 80.96 (49.56 – 156) mg/dL y T2: 79.69 (28.7 – 151) mg/dL,  $p=0.015$ ) y LDL (T3: 102.92 (73.19 – 151.37) mg/dL vs. T1: 83.41 (42 – 172) mg/dL, T2: 100.25 (52.35 – 133.65) mg/dL,  $p= 0.04$ ).

Respecto a los metabolitos de la vitamina D y las variables clínicas de la enfermedad observamos que las pacientes con mayores niveles de calcitriol se ubican en el T3 de sVDR con una mediana de 48.11 (38.24 – 59.46) pg/mL con un valor de  $p=0.04$  en comparación con las ubicadas en el T1 y T2 (T1: 46.26 (31.32 – 50.55) pg/mL y T2: 46.76 (22.56 – 50.79) pg/mL)). De igual manera la pCr se observó más elevada en las pacientes ubicadas en el T3 (6.0 (1.3 – 33) mg/dL) de sVDR en comparación con las ubicadas en el T1 y T2 (T1: 2.74 (0.5 – 33.79) mg/dL y T2: 5.6 (2.3 – 87.7) mg/dL),  $p=0.01$ ) (Cuadro 17).

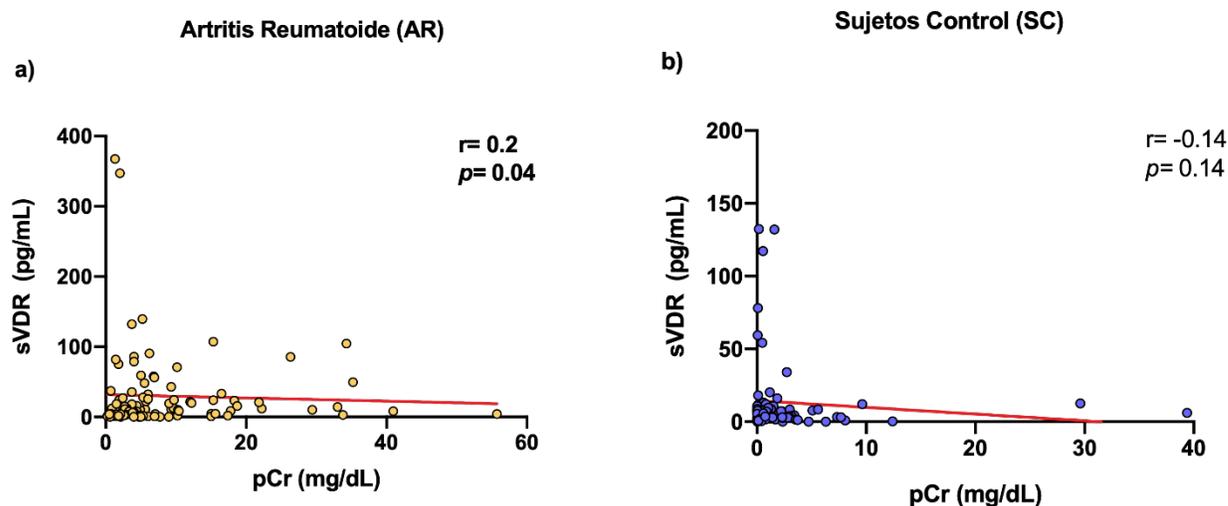
**Cuadro 16. Variables antropométricas, bioquímicas, metabolitos de la vitamina D y variables clínicas de las pacientes con artritis reumatoide (AR) estratificadas por terciles de sVDR**

Artritis reumatoide (AR).	sVDR (pg/mL)			Valor de p*
	T1: 0.72 – 4.67 (pg/mL) (n= 36)	T2: 4.68 – 11.7 (pg/mL) (n=15)	T3: 11.71 – 367 (pg/mL) (n=48)	
<b>Antropométricas</b>				
Edad (años) <sup>a</sup>	45.5 (28 – 67)	42 (22 – 57)	48 (34 – 61)	0.04
Talla (cm) <sup>a</sup>	1.56 (1.48 – 1.66)	1.6 (1.48 – 1.72)	1.56 (1.48 – 1.66)	0.24
Peso (kg) <sup>a</sup>	69 (48.2 - 97.2)	68.1 (51.6 – 104)	66 (51.6 – 88.3)	0.71
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	27.4 (19.8 – 36.6)	26.9 (19.7 – 39.6)	26.8 (20.1– 34.5)	0.86
Cintura (cm) <sup>a</sup>	86 (68 – 116.4)	89 (74 – 122)	91 (69 – 104)	0.43
Cadera (cm) <sup>a</sup>	105.3 (89.1 – 131)	102 (95.5 – 139.5)	103 (91.5 – 118.5)	0.82
ICC <sup>a</sup>	0.8 (0.7 – 0.9)	0.9 (0.7 – 1.01)	0.9 (0.7 – 0.9)	0.03
<b>Bioquímicos</b>				
Glucosa (mg/dL) <sup>a</sup>	86 (76 – 119)	88 (72.58 – 120)	90.46 (78.62 – 127)	0.10
Albúmina (g/dL) <sup>a</sup>	3.88 (3.33 – 4.63)	3.97 (3.2 – 4.49)	3.95 (3.15 – 4.46)	0.99
Triglicéridos (mg/dL) <sup>a</sup>	80.96 (49.56 – 156)	76.69 (28.7 – 151)	110.27 (63.81 – 195)	0.01
Colesterol (mg/dL) <sup>a</sup>	160.29 (119.23 – 244.21)	173 (81.3 – 217.5)	177 (123 – 247)	0.11

HDL (mg/dL) <sup>a</sup>	49.48 (32.63 – 76.24)	45.64 (15.57 – 65.46)	44.34 (28.99 – 77.45)	0.61
<b>LDL (mg/dL)<sup>a</sup></b>	<b>83.41 (42 – 172)</b>	<b>100.25 (52.35 – 133.65)</b>	<b>102.92 (73.19 – 151.37)</b>	<b>0.02</b>
<b>Metabolitos vitamina D</b>				
Calcidiol (ng/mL) <sup>a</sup>	24.32 (10.16 – 44.81)	20.69 (8.94 – 37.45)	20.79 (8.88 – 35.29)	0.21
<b>Calcitriol (pg/mL)<sup>a</sup></b>	<b>46.26 (31.32 – 50.55)</b>	<b>46.76 (22.56 – 50.79)</b>	<b>48.11 (38.24 -59.46)</b>	<b>0.04</b>
<b>VARIABLES CLÍNICAS</b>				
Tiempo de evolución (años) <sup>a</sup>	6.5 (1 - 25)	3 (0.5 – 13 )	7.5 (1 – 22)	0.11
DAS28 <sup>a</sup>	3.34 (1.78 – 5.46)	2.84 (1.12 – 5.9)	2.5 (1.33 – 5.85)	0.05
Articulaciones inflamadas <sup>a</sup>	2 (0 – 5)	0 (0 – 6)	0 (0 – 7)	0.11
<b>Articulaciones dolorosas<sup>a</sup></b>	<b>3 (0 -12)</b>	<b>2 (0 – 8)</b>	<b>1 (0 – 7)</b>	<b>0.02</b>
VSG (mm/hora) <sup>a</sup>	41 (15 – 63)	35 (10 -48)	22 (7 – 58)	0.13
<b>pCr (mg/dL)<sup>a</sup></b>	<b>2.74 (0.5 – 33.79)</b>	<b>5.6 (2.3 – 87.7)</b>	<b>6 (1.3 – 33)</b>	<b>0.01</b>
Factor reumatoide <sup>a</sup> (UI/L) <sup>a</sup>	51.1 (11 – 2560)	105 (48.4 – 156.8)	101.5 (9.6 -177)	0.96
Anti-CCPs (U/mL) <sup>a</sup>	232 (67 – 549)	223 (20.98 – 493.5)	62 (1 – 200)	0.21

HDL: Colesterol de alta densidad; LDL: Colesterol de baja densidad; IMC: índice de masa corporal; ICC: índice cintura cadera; VSG: Velocidad de sedimentación globular; pCr: proteína C reactiva; Anti CCPs: Anticuerpos antipeptidos citrulinados. <sup>a</sup>Datos expresados en mediana (p5-p95). \*Prueba Kruskal-Wallis.

De acuerdo con lo anterior se realizó un análisis de correlación entre los niveles séricos de pCr (mg/dL) con sVDR (pg/mL) en ambos grupos de estudio. En el caso de las pacientes con AR se observó correlación positivamente entre las variables con una  $r=0.02$  y un valor de  $p=0.04$  (Figura 27a).



**Figura 26. Correlaciones entre pCr con sVDR en pacientes con AR y SC.**

Prueba de correlación de *Spearman*.

Otro aspecto realizado fue el análisis de genotipificación de 201 SC y 146 pacientes con AR para los polimorfismos *FokI*, *Apal* y *TaqI* y 196 SC y 117 pacientes con AR para el polimorfismo *BsmI* ubicados en el gen *VDR*. La distribución alélica del polimorfismo *FokI VDR* en el grupo de AR fue de 51% para el alelo silvestre C y 49% para el polimórfico T. En el grupo de SC fue de 54% y 46%, respectivamente. La distribución genotípica del polimorfismo *FokI* fue de 28% para el genotipo homocigoto CC en AR y 29% en SC, para el homocigoto TT 25% en AR y 21% en SC. El genotipo heterocigoto CT se presentó en el 47% de las pacientes con AR y 50% de SC sin diferencias significativas entre ambos grupos (Cuadro 18).

**Cuadro 17. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *FokI* en el gen *VDR* en pacientes con AR y SC.**

Polimorfismo	AR % (n=146)	SC % (n=201)	Valor de p*	OR (IC 95%)	Valor de p*
<b><i>FokI</i></b>					
<b>Genotipo</b>					
CC §	28 (41)	29 (59)	0.6	<b>1</b>	
CT	47 (68)	50 (100)		0.98 (0.57 – 1.67)	0.9
TT	25 (37)	21 (42)		1.27 (0.67 – 2.39)	0.4
<b>Alelo</b>					
C §	51 (150)	54 (218)	0.45	<b>1</b>	
T	49 (142)	46 (184)		1.21 (0.82 – 1.53)	0.4
<b>Modelo genético</b>					
<b>Do</b> CC CT+TT §	28 (41) 72 (105)	29 (59) 71 (142)	0.79	<b>1</b> 1.06 (0.65 – 1.76)	0.79

\*prueba de  $\chi^2$ ; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza; Do: modelo genético de herencia dominante; §: categoría de referencia. , AR: Artritis reumatoide; SC: Sujetos control.

Posteriormente se realizó el análisis para el modelo genético de herencia dominante donde no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos ( $p= 0.79$ ) (Cuadro 18).

Con valores de  $p > 0.05$  en los OR para las frecuencias alélicas, genotípicas y en el modelo genético dominante no podemos atribuir riesgo o protección a ninguna variante genética evaluada hasta el momento en ambos grupos (Cuadro 18).

Al comparar las frecuencias genotípicas observadas con las esperadas en ambos grupos de estudio se obtuvo un valor de  $p= 0.2$ , por lo tanto, se infiere que nuestra población está en equilibrio génico de Hardy-Weinberg.

La distribución alélica del polimorfismo *BsmI* del gen *VDR* para el grupo de AR fue de 25% para el alelo silvestre A y 75% para el alelo polimórfico G. En el grupo de sujetos control fue de 23% y 77%, respectivamente. La distribución de genotipos del polimorfismo *BsmI* fue de 5% en pacientes con AR y 4% en SC para los portadores del genotipo AA. Para el genotipo GG, 55% en pacientes con AR y 59% en SC. Para el genotipo heterocigoto AG respectivamente fue 40% en AR y 36% en SC. No se observaron diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas entre ambos grupos ( $p= 0.8$  y  $p= 0.5$ ) (Cuadro 19).

**Cuadro 18. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *BsmI* en el gen *VDR* en pacientes con AR y SC**

Polimorfismo	AR % (n=146)	SC % (n=201)	Valor de p*	OR (IC 95%)	Valor de p*
<b><i>BsmI</i></b>					
<b>Genotipo</b>					
AA	5 (7)	4 (9)		1.14 (0.35 – 3.60)	0.79
AG	40 (58)	36 (73)	0.8	1.17 (0.73 – 1.87)	0.49
GG §	55 (81)	59 (119)		<b>1</b>	
<b>Alelo</b>					
A	25 (72)	23 (91)	0.5	1.12 (0.77 – 1.62)	0.53
G§	75 (220)	77 (311)		<b>1</b>	
<b>Modelo genético</b>					
Do AA	5 (7)	4 (9)	0.9	<b>1</b>	
AG+GG §	95 (139)	96 (192)		1.07 (0.33 – 3.33)	0.89
*prueba de $\chi^2$ ; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza; Do: modelo genético de herencia dominante; §: categoría de referencia. , AR: Artritis reumatoide; SC: Sujetos control.					

Posteriormente se realizó el análisis para el modelo genético de herencia dominante donde no se observó diferencia entre ambos grupos ( $p= 0.9$ ) (Cuadro 18).

Con valores de  $p > 0.05$  en los OR para las frecuencias alélicas, genotípicas y en el modelo genético dominante no se infiere riesgo genético para los portadores de la variantes genética *BsmI* y la artritis reumatoide.

Al comparar las frecuencias genotípicas observadas con las esperadas en ambos grupos de estudio se obtuvo un valor de  $p= 0.6$ , por lo tanto, se infiere que nuestra población está en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Respecto al polimorfismo *Apal* del gen *VDR* las frecuencias relativas en cuanto a la distribución alélica para el grupo de AR fueron de 51% y 43% en SC para el alelo silvestre A y 49% vs 57% para el alelo polimórfico C respectivamente ( $p=0.12$ ). La distribución genotípica en AR fue de 24% vs 19% en SC para el genotipo homocigoto AA, 23% vs. 32% portadores homocigotos CC y 53% vs. 49% los portadores del genotipo heterocigoto AC respectivamente (Cuadro 20).

**Cuadro 19. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *Apal* en el gen *VDR* en pacientes con AR y SC**

Polimorfismo	AR % (n=146)	SC % (n=201)	Valor de p*	OR (IC 95%)	Valor de p*
<b><i>Apal</i></b>					
<b>Genotipo</b>					
AA	24 (35)	19 (38)	0.12	1.16 (0.64 – 2.07)	0.6
AC <sup>§</sup>	53 (78)	49 (98)		<b>1</b>	
CC	23 (33)	32 (65)		0.64 (0.37 – 1.09)	0.09
<b>Alelo</b>					
A	51 (148)	43 (174)	0.054	1.35 (0.98 – 1.84)	0.05
C <sup>§</sup>	49 (144)	57 (228)		<b>1</b>	
<b>Modelo genético</b>					
<b>Do</b>				<b>1</b>	
AA	24 (35)	19 (38)	0.41	1.24 (0.72 – 2.15)	0.4
AC+CC <sup>§</sup>	76 (121)	81 (163)			

\*prueba de  $\chi^2$ ; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza; Do: modelo genético de herencia dominante; §: categoría de referencia. , AR: Artritis reumatoide; SC: Sujetos control.

De acuerdo a el análisis para el modelo genético de herencia dominante no se observó diferencia entre los grupos ( $p= 0.4$ ).

Con valores de  $p > 0.05$  en los OR para las frecuencias alélicas, genotípicas y en el modelo genético dominante no se infiere riesgo genético para los portadores de la variante genética *Apal* y la artritis reumatoide.

Al comparar las frecuencias genotípicas observadas con las esperadas en ambos grupos de estudio se obtuvo un valor de  $p = 0.6$ , por lo tanto, se infiere que nuestra población está en equilibrio de Hardy-Weinberg.

En el análisis del polimorfismo *TaqI* del gen *VDR* las frecuencias observadas en la distribución alélica para el grupo de AR fueron de 36% para el alelo silvestre C y 64% para el alelo polimórfico T vs. 25% y 75%, respectivamente en los SC ( $p = 0.001$ ). La distribución de genotipos del polimorfismo *TaqI* en el grupo de AR fue de 10% para el genotipo homocigoto CC, 38% portadores homocigotos TT y 52% son portadores del genotipo heterocigoto CT.

De acuerdo a un análisis de regresión lineal observamos que los portadores de los genotipo CC y CT poseen riesgo genético mayor de padecer AR (CC: OR=3 (1.16 – 7.94),  $p = 0.01$ ; CT: OR= 1.87 (1.17 – 3.02),  $p < 0.01$ ) en comparación con aquellos portadores del genotipo TT y de acuerdo al modelo de herencia recesivo observamos que ser portadora del alelo C aumenta 2 veces el riesgo de padecer AR (OR= 2 (1.26 – 3.16),  $p = 0.02$ )(Cuadro 21).

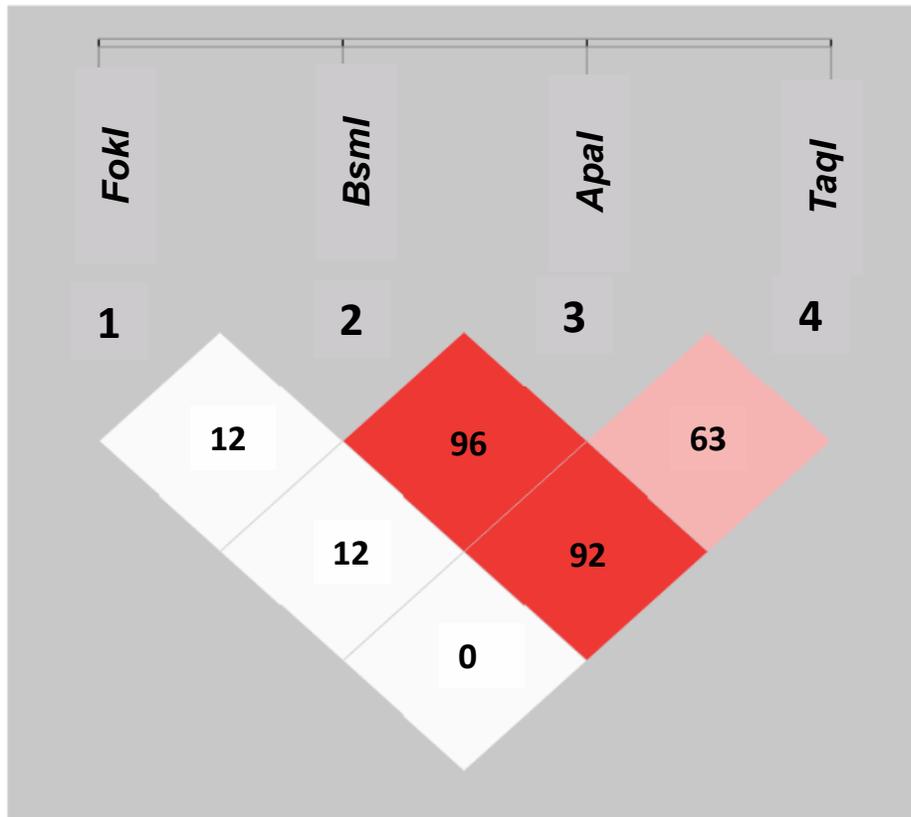
**Cuadro 20. Frecuencias genóticas y alélicas del polimorfismo *TaqI* en el gen *VDR* en pacientes con AR y SC.**

Polimorfismo	AR % (n=146)	SC % (n=201)	Valor de p*	OR (IC 95%)	Valor de p*
<b><i>TaqI</i></b>					
<b>Genotipo</b>					
CC	10 (15)	5 (10)		<b>3 (1.16 – 7.94)</b>	<b>0.01</b>
CT	52 (76)	40 (81)	<b>0.004</b>	<b>1.87 (1.17 – 3.02)</b>	<b>&lt;0.01</b>
TT <sup>§</sup>	38 (55)	55 (110)		<b>1</b>	
<b>Alelo</b>					
C	36 (106)	25 (101)	<b>0.001</b>	<b>1.69 (1.21 – 2.39)</b>	<b>0.001</b>
T <sup>§</sup>	64 (186)	75 (301)		<b>1</b>	
<b>Modelo genético</b>					
Re	62 (91)	45 (91)	<b>0.001</b>	<b>2 (1.26 – 3.16)</b>	<b>0.001</b>
CC + CT	38 (55)	55 (110)		<b>1</b>	
TT <sup>§</sup>					

\*prueba de  $\chi^2$ ; OR: odds ratio; IC: intervalo de confianza; Do: modelo genético de herencia dominante;  
<sup>§</sup>: categoría de referencia. , AR: Artritis reumatoide; SC: Sujetos control.

Al comparar las frecuencias genóticas observadas con las esperadas en ambos grupos de estudio se obtuvo un valor de  $p=0.3$ , por lo tanto, se infiere que nuestra población está en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Se realizó la prueba de Lewontin D' corregida para determinar el desequilibrio el ligamiento de los polimorfismos *FokI*, *BsmI*, *ApaI* y *TaqI* en el gen *VDR* (Figura 28).



**$D' > 0.7$ : Desequilibrio de ligamiento fuerte**

**Figura 27. Diamante de desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos *FokI*, *BsmI*, *ApaI* y *TaqI* ubicados en el gen de *VDR*.**

Prueba de *Lewontin D'* corregida. Casos observados: 196 sujetos control (SC) y 117 pacientes con artritis reumatoide (AR).

Observamos en desequilibrio de ligamiento (DL) a *BsmI* y *ApaI* con una  $D'=0.96$ , a los polimorfismos *BsmI* y *TaqI* con una  $D'=0.92$  y *ApaI* – *TaqI* con una  $D'=0.63$ . En el caso de *FokI* con un valor  $D' < 0.5$  podemos inferir que no se encuentra en LD con los tres polimorfismos río abajo en el gen *VDR* (*BsmI*, *ApaI* y *TaqI*) (Figura 28).

Se analizaron las frecuencias haplotípicas de los polimorfismos que se encuentran en desequilibrio de ligamiento (*BsmI*, *ApaI* y *TaqI*) y se infirieron los probables haplotipos en la muestra con el algoritmo de máxima verosimilitud de Excoffier y Slatkin (Cuadro 22). Observamos que el 39% de los casos de AR y 53% de los SC son portadores del haplotipo GCT, en el caso del haplotipo AAC su presencia fue

del 24% en AR y 22% en SC, para el haplotipo GAT la frecuencia fue de 23% en AR y 20% en SC, el haplotipo GCC se presentó con una frecuencia de 10% en AR y 2% en el grupo de SC. El haplotipo GAC está presente en el 3% de AR y 1% en SC. Los haplotipos AAT y ACT se presentaron en <5% en ambos grupos. Los portadores de los haplotipos AAC, GAT y GCC presentaron riesgo genético mayor para la AR (AAC: OR= 1.14 (1.06 – 2.59),  $p=0.02$ ; GAT: OR= 2.0 (1.28 – 3.13),  $p=0.001$ ; GCC: OR=6.6 (2.91 – 15.96),  $p<0.001$ ). Cabe destacar que los haplotipos AAC y GCC son portadores del alelo de riesgo C de *TaqI*. Sin embargo, para el haplotipo GCC estos resultados tiene que tomarse con precaución, debido a la baja probabilidad de presentarse en la población estudiada (Cuadro 22).

**Cuadro 21. Frecuencias haplotípicas inferidas de los polimorfismos *BsmI*, *ApaI* y *TaqI* en VDR en ambos grupos de estudio.**

HAPLOTIPO	AR % (n=292 )	SC % (n = 394)	OR (IC 95%)	Valor de $p^*$
G C T <sup>§</sup>	39 (115)	53 (210)	1	-
A A C	24 (69)	22 (85)	1.14 (1.06 – 2.59)	0.02
G A T	23 (68)	20 (79)	2.00 (1.28 – 3.13)	0.001
G C C	10 (29)	2 (10)	6.6 (2.91 – 15.96)	<0.001
G A C	3 (8)	1 (5)	3.05 (0.75– 12.94)	0.05
A A T	1 (4)	1 (3)	3.39 (0.55 – 23.52)	0.09
A C T	-	1 (2)	-	-

OR= odds ratio; IC= Intervalo de confianza; \* prueba de  $\chi^2$ ; AR: Artritis reumatoide; SC: sujetos control.

Se realizó la estimación de las frecuencias haplogenotípicas por conteo directo de acuerdo con las combinaciones de los haplotipos homocigotos presentes en ambos grupos (Cuadro 23). Se omitieron todos aquellos haplogenotipos que fueron calculados probabilísticamente con una frecuencia <5% y que no estuvieron

presentes en la población. El haplogenotipo más frecuente en ambos grupos fue el haplogenotipo homocigoto GCT/GCT (AR:13%, vs. SC:28%), seguido de los heterocigotos AAC/GCT (AR:21%, vs. SC:26%) y GAT/GCT (AR: 20% vs. SC: 19%).

**Cuadro 22. Frecuencias haplogenotípicas de los polimorfismos *BsmI*, *Apal* y *TaqI* de VDR en ambos grupos de estudio**

HAPLOGENOTIPOS	AR % (n = 146)	SC % (n = 201)	Valor de p*	OR (IC 95%)	Valor de p*
GCT/GCT §	13 (19)	28 (57)		1	-
AAC/GCT	21 (31)	26 (53)		1.75 (0.84 – 3.69)	0.10
GAT/GCT	20 (29)	19 (39)		2.23 (1.04 – 4.82)	0.02
AAC/GAT	11 (16)	7 (15)		3.2 (1.21 – 8.40)	<0.01
GAT/GAT	5 (7)	6 (12)		1.75 (0.50 – 5.66)	0.30
GAC/GCT	7 (10)	2 (5)	<0.001	6 (1.58 – 24.77)	0.001
GCC/GCT	10 (14)	2 (5)		8.4 (2.39 – 33.01)	<0.001
AAC/AAC	3 (4)	3 (6)		2 (0.37 – 9.43)	0.31
AAC/GCC	5 (9)	1 (1)		-	-
Otros	6 (8)	4 (8)		-	-

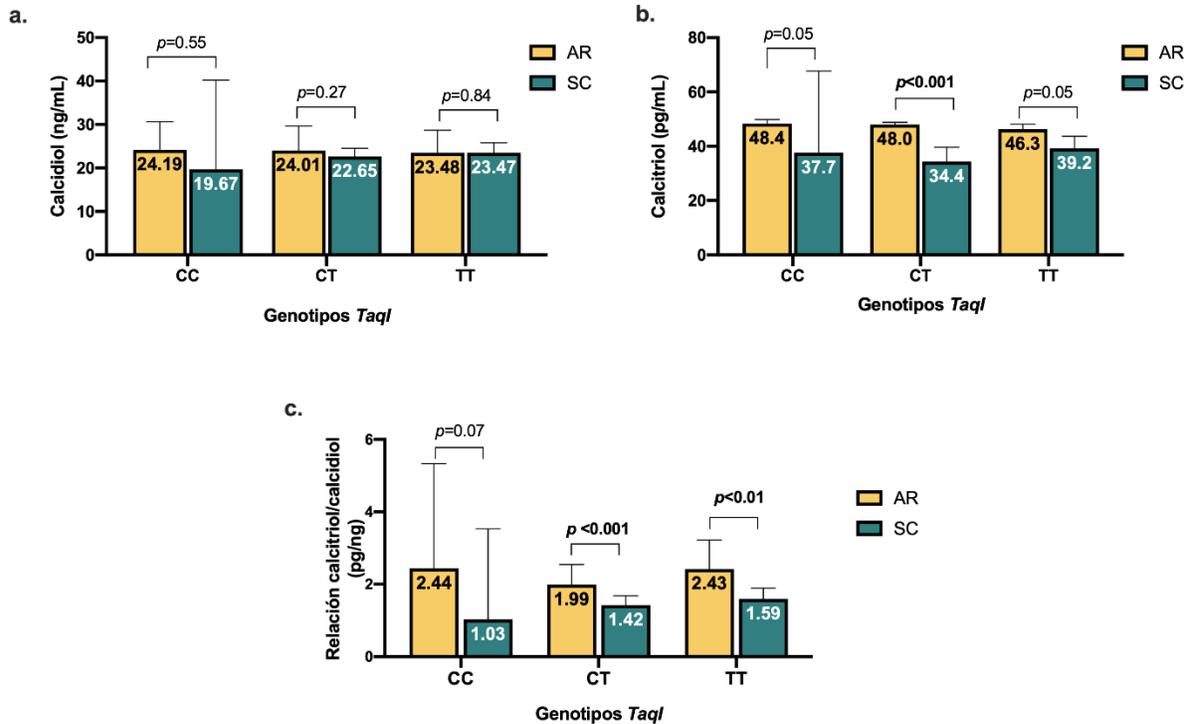
Se agruparon en otros los haplogenotipos con una frecuencia  $\leq 5\%$ . AR: Artritis reumatoide; SC: Sujetos control; OR: Odds ratio. \*Prueba  $\chi^2$ .

Además se infirió que los portadores de los haplogenotipos GAT/GCT y AAC/GAT que portan el alelo de riesgo T de *TaqI* poseen 2.9 veces y 4.4 veces riesgo genético mayor respectivamente para AR (OR= 2.23 (1.04 – 4.82),  $p=0.02$ ; OR= 3.2 (1.21 –

8.40),  $p < 0.01$ ). Así también, los haplogenotipos GAC/GCT y GCC/GCT confieren riesgo genético mayor para la AR ( $p < 0.001$ ); sin embargo, estos resultados tienen que tomarse con precaución, debido a la baja frecuencia de los haplogenotipos GAC/GCT y GCC/GCT en la población estudiada (Cuadro 23).

Considerando los resultados obtenidos de los análisis de las frecuencias genotípicas y alélicas, así como las variantes que se observaron asociadas con riesgo genético se analizaron los niveles séricos de calcidiol (ng/mL), calcitriol (pg/mL) y la relación calcitriol/calcidiol (pg/ng) categorizados por los genotipos del polimorfismo *TaqI* en *VDR* en ambos grupos de estudio (Figura 28). No observamos diferencia significativa en los niveles séricos de calcidiol entre los distintos genotipos del polimorfismo *TaqI* (Figura 28a). En el caso del calcitriol las pacientes con AR presentaron niveles séricos mayores (CC: 48.36 (32.91 - 55.31) pg/mL; CT: 48.00 (38.24 - 52.8) pg/mL y TT: 46.3 (29.94 - 59.46) pg/mL) vs. SC (CC: 37.65 (20.29 - 67.88) pg/mL; CT: 34.37 (7.94 - 56.67) pg/mL y TT: 39.22 (12.92 - 120.2) pg/mL). Sin embargo, la diferencia solo fue significativa entre las pacientes portadoras del genotipo heterocigoto CT ( $p < 0.001$ ) (Figura 28b).

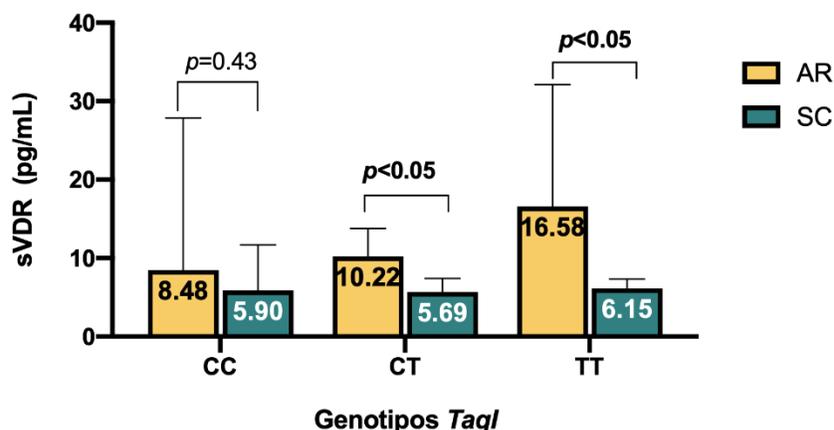
En ese sentido también se analizó la relación calcitriol/calcidiol por genotipos *TaqI* en ambos grupos de estudio. Se observó que las pacientes con AR portadoras de los genotipos CT y TT hidroxilan más calcidiol a calcitriol en comparación con las SC portadoras de los mismos genotipos (AR: CT= 1.95 (1.1 - 5.11) pg/ng vs. SC: CT= 1.42 (0.3 - 2.85) pg/ng,  $p < 0.001$ ; AR: TT= 2.42 (0.89 - 5.42) pg/ng vs. SC: TT= 1.59 (0.37 - 5.12),  $p < 0.01$ ) (Figura 28c).



**Figura 28. Niveles séricos de calcidiol (ng/mL), calcitriol (pg/mL) y relación calcitriol/calcidiol (pg/mL/ng/mL) categorizados por los genotipos del polimorfismo TaqI VDR en pacientes con artritis reumatoide (AR) y sujetos control (SC)**

Datos proporcionados en mediana (p5 – p95). Prueba U de Mann Whitney

Por otra parte, se analizaron los niveles séricos de sVDR (pg/mL) de acuerdo con los polimorfismos de TaqI VDR en ambos grupos. De nuevo se observó que las pacientes con AR portadoras de los genotipos CT y TT poseen mayores niveles de sVDR en comparación con los SC portadores del mismo genotipo (AR: CT= 10.22 (0.73 – 90.38) pg/mL vs. SC: CT= 5.69 (0.54 – 54.21) pg/mL,  $p < 0.05$ ; AR: TT= 16.58 (0.03 – 367.4) pg/mL vs. SC: TT= 6.15 (0.16 – 117.2) pg/mL,  $p < 0.05$ ) (Figura 29).



**Figura 29. Niveles de sVDR estratificados por genotipo del polimorfismo *TaqI* *VDR* en pacientes con AR y SC.**

Datos proporcionados en mediana (p5 - p95).\*\*Prueba U de Mann Whitney.

A continuación se analizaron los niveles séricos de calcidiol y calcitriol estratificados por los haplogenotipos de los polimorfismos *BsmI*, *Apal* y *TaqI* en el gen *VDR* que observamos en desequilibrio de ligamiento en nuestros grupos de estudio. No se encontraron diferencias en las concentraciones de calcidiol entre pacientes con AR y SC, ni entre los distintos haplogenotipos inferidos (Cuadro 23).

**Cuadro 23. Niveles séricos de calcidiol estratificados de acuerdo con los haplogenotipos de los polimorfismos de *BsmI*, *Apal* y *TaqI* en el gen *VDR*.**

Niveles séricos de calcidiol (ng/mL) de acuerdo con los haplogenotipos			
Haplogenotipo	AR (n = 117)	SC (n = 196)	Valor de p*
GCT/GCT §	15.66 (6.15 – 37.64)	24.70 (10.23 – 35.86)	0.10
AAC/GCT	20.69 (10.10 – 65.16)	23 (14.93 – 20.69)	0.30
GAT/GCT	22.0 (9.19 – 42.37)	22.31 (11.25 – 41.11)	0.98
AAC/GAT	29.32 (9.38 – 60.65)	23.89 (16.15 – 37.55)	0.78
GAT/GAT	27.28 (15.80 - 53.87)	23.20 (8.27 – 40.28)	0.23
GAC/GCT	28.19 (17.56 – 37.45)	15 (13.09 – 26.28)	0.06
GCC/GCT	23.47 (12.69 – 44.81)	21.43 (9.16 – 24.51)	0.37
AAC/AAC	12.24 (5.35 – 47.4)	19.67 (12.45 – 44.26)	0.54

AAC/GCC	10.91	21.83 (8.88 – 30.59)	-
Otros	25.26 (16.76 – 33.91)	23.90 (15.03 - 40.18)	0.46
<b>Valor de p#</b>	0.32#	0.37#	

Datos proporcionados en mediana (p5 – p95). \* Prueba U de Mann Whitney\*\*. Datos de un solo paciente. #Prueba Kruskal Wallis.

Para el caso del calcitriol (pg/mL) las pacientes con AR portadoras del haplogenotipo AAC/GCT tienen niveles séricos mayores de calcitriol que los SC portadores del mismo haplogenotipo (AR: 48.99 (46.35 – 52.8) pg/mL vs. SC: 34.37 (5.60 – 56.67) pg/mL,  $p < 0.001$ ). Así mismo, para el haplogenotipo GAT/GCT las pacientes con AR tienen una mediana más alta de calcitriol vs. las SC (AR: 46 (21 – 72.75) pg/mL vs. SC: 36.45 (12.5 – 107.3) pg/mL,  $p = 0.03$ ) (Cuadro 25).

**Cuadro 24. Niveles séricos de calcitriol estratificados de acuerdo con los haplogenotipos de los polimorfismos de *BsmI*, *Apal* y *TaqI* en el gen *VDR*.**

Niveles séricos de calcitriol (pg/mL) de acuerdo con los haplogenotipos			
Haplogenotipo	AR (n = 85)	SC (n = 163)	Valor de p*
GCT/GCT §	46.91 (29.94 – 50.5)	38.06 (15.76 – 120.2)	0.18
<b>AAC/GCT</b>	<b>48.99 (46.35 – 52.8)</b>	<b>34.37 (5.60 – 56.67)</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>GAT/GCT</b>	<b>46 (21 – 72.75)</b>	<b>36.45 (12.5 – 107.3)</b>	<b>0.03</b>
AAC/GAT	47.26 (35.5 – 51.29)	39.29 (21.78 – 99.54)	0.07
GAT/GAT	40.26 (33.91 – 46.61)	48.68 (22.79 – 76.38)	0.58
GAC/GCT	46.63 (38.24 – 54.63)	29.94 (7.93 – 48.84)	0.27
GCC/GCT	47.73 (39.13 – 110.7)	-	-
AAC/AAC	48.22 (47.06 – 49.39)	45.6 (20.29 – 67.68)	0.38
AAC/GCC	48.89 (32.91 – 55.31)	-	-
OTROS	47.87 (32.75 – 54.63)	24.17 (8.45 – 627.8)	0.07
<b>Valor de p#</b>	0.22#	0.30#	

Datos proporcionados en mediana (p5 –p95). \*Prueba U de Mann Whitney. #Prueba Kruskal Wallis.

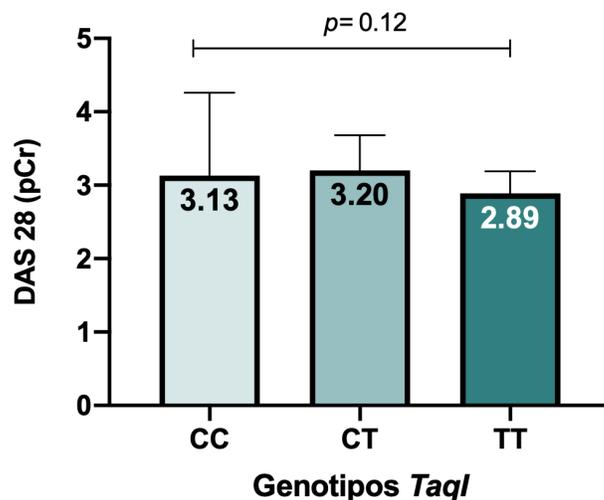
De igual forma se analizaron los niveles de sVDR (pg/mL) de acuerdo con los haplogenotipos de los polimorfismos *BsmI*, *ApaI* y *TaqI* en el gen *VDR*. Se observaron niveles mayores de sVDR en las pacientes con AR portadoras del haplogenotipo homocigoto GCT en comparación con las SC portadoras del mismo haplogenotipo (AR: 21.05 (1.97 – 367.4) pg/mL vs. SC: 6.96 (2.29 – 117.2) pg/mL,  $p=0.02$ ). El mismo caso para las pacientes AR portadoras del haplogenotipo GAT/GCT que tienen una mediana de 20.66 (1.26 – 347) pg/mL vs. las SC con una mediana de 6.00 (2.09 – 78.15) pg/mL, con un valor de  $p=0.01$  (Cuadro 26).

**Cuadro 25. Niveles séricos de sVDR estratificados de acuerdo con los haplogenotipos de acuerdo con los haplogenotipos de los polimorfismos de *BsmI*, *ApaI* y *TaqI* en el gen *VDR*.**

Niveles séricos de sVDR (pg/mL) de acuerdo con los haplogenotipos			
Haplogenotipo	AR (n = 110)	SC (n = 99)	Valor de p*
<b>GCT/GCT §</b>	<b>21.05 (1.97 – 367.4)</b>	<b>6.96 (2.29 – 117.2)</b>	<b>0.02</b>
AAC/GCT	8.16 (1.45 – 132)	6.37 (2.01 – 54.21)	0.42
<b>GAT/GCT</b>	<b>20.66 (1.26 – 347)</b>	<b>6.00(2.09 – 78.15)</b>	<b>0.01</b>
AAC/GAT	6.75 (1.65 – 104.6)	6.84 (1.03 – 12.11)	0.94
GAT/GAT	55.86 (4.42 – 107.3)	5.05 (3.29 – 8.68)	0.53
GAC/GCT	20.66 (1.26 – 347)	70.24 (8.48 – 132)	0.66
GCC/GCT	14.82 (0.72 – 90.38)	-	-
AAC/AAC	35.54 (21.46 – 49.63)	5.89 (4.38 – 8.68)	0.2
AAC/GCC	48.89 (32.91 – 55.31)	-	-
Otros	70.97 (8.48 – 139.4)	1.69 (1.65 – 11.69)	0.66
<b>Valor de p#</b>	<b>0.17#</b>	<b>0.64#</b>	

Datos proporcionados en mediana (p5 – p95). \*Prueba *U de Mann Whitney*. #Prueba *Kruskall Wallis*.

Por último, se analizó el índice de actividad clínica DAS28 en las pacientes con AR categorizado por genotipos de *TaqI* VDR y haplogenotipos de *BsmI*, *Apal* y *TaqI*. En ambos análisis no se observó diferencia en el puntaje DAS 28 entre las pacientes portadoras de los genotipos de *TaqI* VDR (Figura 31) y los distintos haplogenotipos de *BsmI*, *Apal* y *TaqI* (Cuadro 27).



**Figura 30. Puntaje DAS 28 de las pacientes con AR estratificado por genotipos del polimorfismo *TaqI* VDR.**

Datos proporcionados en mediana (p5 –p95). Valor de *p*: prueba Kruskal Wallis.

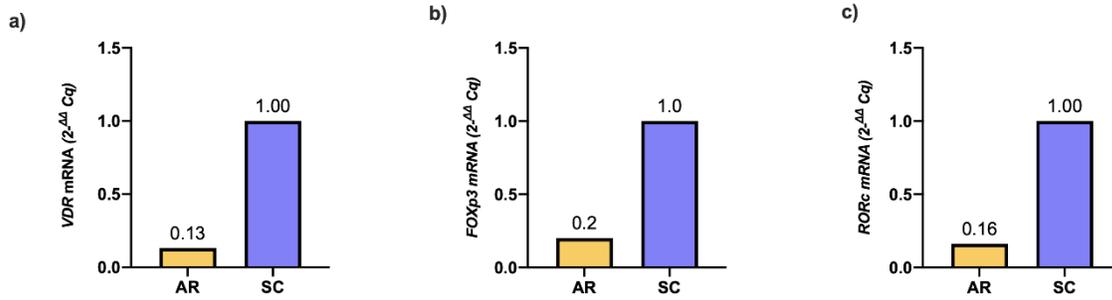
**Cuadro 26. Puntaje DAS 28 de las pacientes con AR estratificado de acuerdo con los haplogenotipos de los polimorfismos *BsmI*, *Apal* y *TaqI* en el gen *VDR*.**

Puntaje DAS 28 de las pacientes con artritis reumatoide (AR) de acuerdo con los haplogenotipos		
Haplogenotipo	DAS28 AR (n = 131)	Valor de p*
GCT/GCT §	3.1 (1.22 – 6.18)	0.41*
AAC/GCT	3.71 ( 1.47 – 5.9)	
GAT/GCT	2.85 (1.12 – 4.26)	
AAC/GAT	2.75 (1.74 – 5.4)	
GAT/GAT	3.04 (1.96 – 4.23)	
GAC/GCT	3.05 (1.73 – 3.72)	
GCC/GCT	3.57 (1.61 – 6.2)	
AAC/AAC	3.08 (1.96 – 4.64)	
AAC/GCC	3.59 (1.5 – 6.35)	
Otros	2.36 (1.21 – 4.29)	

Datos proporcionados en mediana (p5 – p95). \*Prueba *Kruskall Wallis*.

Además, se analizó la expresión de los genes *VDR*, *RORC* y *FOXP3* en leucocitos de sangre periférica de pacientes con AR y SC usando el método de cuantificación  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ . Como gen de referencia se utilizó *GAPDH* (del inglés *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*).

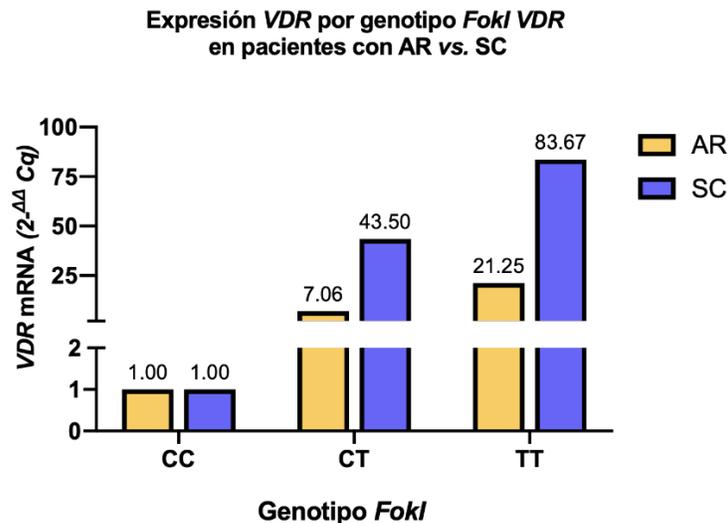
En la comparación entre grupos, observamos de manera general que las pacientes con AR tienen menor expresión de los genes de interés. Observamos que las pacientes con AR expresan 7.86 menos veces *VDR* ( $2^{-\Delta\Delta Cq} = 0.13$ ), 6.26 menos veces *RORC* ( $2^{-\Delta\Delta Cq} = 0.16$ ) y 5.09 menos veces *FOXP3* ( $2^{-\Delta\Delta Cq} = 0.19$ ) al compararlas con las SC como categoría de referencia (Figura 32).



**Figura 31. Expresión mRNA VDR, FOXP3 y RORC en pacientes con AR vs. SC.**

a) Expresión mRNA VDR en pacientes AR y SC; b) Expresión mRNA FOXP3 en pacientes AR y SC ; c) Expresión mRNA RORC en pacientes AR y SC. AR= Artritis reumatoide. SC= Sujetos controles. Categoría de referencia = 1. Datos expresados en 2- ΔΔ Cq normalizados con mRNA de GAPDH como gen de referencia.

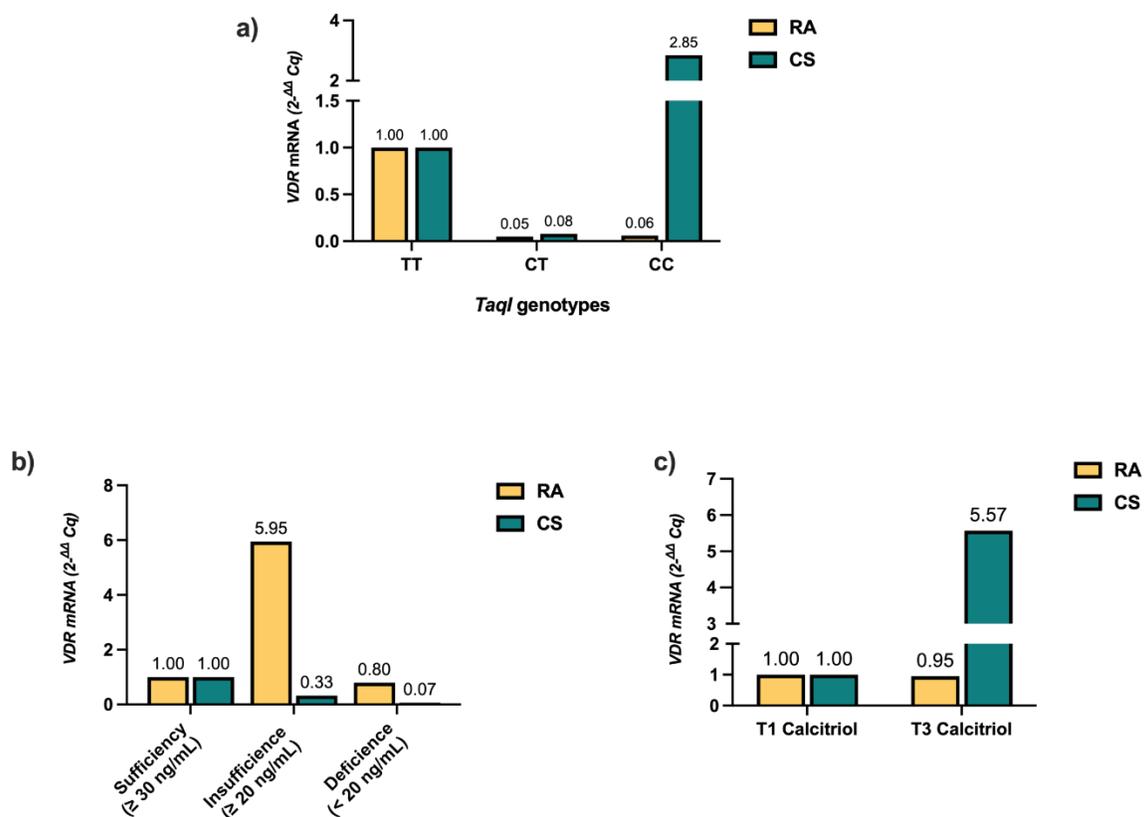
Respecto a la expresión de VDR analizada por genotipo de *FokI* (genotipo homocigoto silvestre CC se tomó de referencia), observamos que las pacientes con AR expresan menos VDR que las SC portadoras de los genotipos heterocigoto CT y homocigoto TT (CT: AR= 7.06 vs. SC= 43.50; TT: AR= 21.25 vs. 83.67) (Figura 33).



**Figura 32. Análisis de expresión mRNA VDR en pacientes AR y SC por genotipo del polimorfismo *FokI*.**

Expresión mRNA VDR en pacientes AR y SC por genotipo *FokI* (CC: genotipo de referencia). Categoría de referencia = 1. Datos expresados en 2- ΔΔ Cq normalizados con mRNA de GAPDH como gen de referencia.

Así mismo, se realizó el análisis de expresión de *VDR* por genotipo de *TaqI* (genotipo homocigoto silvestre TT se consideró de referencia). Observamos que las pacientes AR y SC portadoras del genotipo heterocigoto CT expresan menos *VDR* que las pacientes AR y SC portadoras del genotipo de referencia TT (AR:CT  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ = 0.05, SC:CT  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ = 0.08). En el caso de las pacientes AR portadoras del genotipo CC expresan 16.6 menos veces *VDR* que las pacientes AR portadoras del mismo genotipo ( $2^{-\Delta\Delta Cq}$ = 0.06). De forma contraria las SC portadoras del genotipo CC expresan 2.85 veces más *VDR* que las SC portadoras del genotipo TT (Figura 34a).

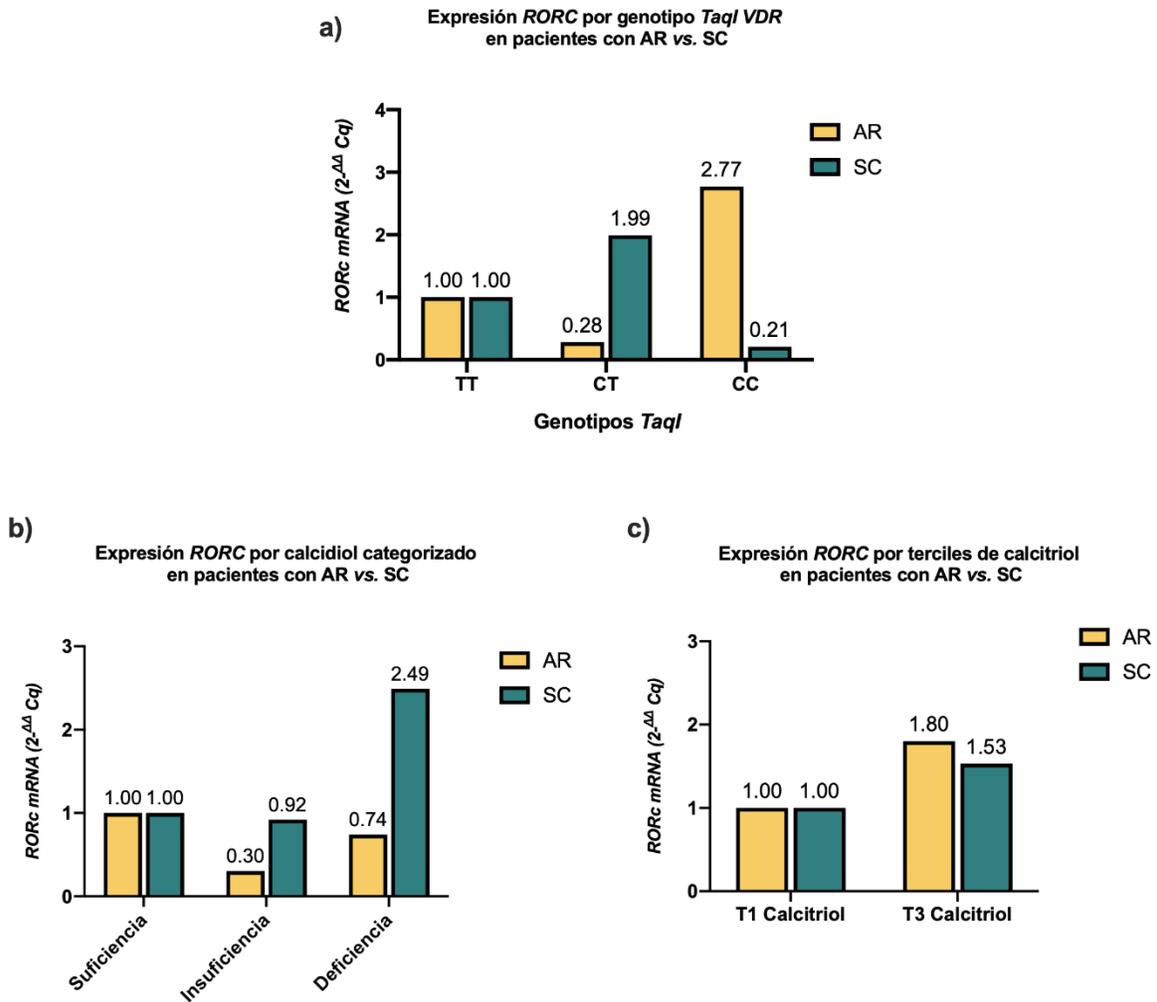


**Figura 33. Análisis de expresión mRNA *VDR* en pacientes AR y SC.**

a) Expresión mRNA *VDR* en pacientes AR y SC por genotipo *TaqI* (TT: genotipo de referencia); b) Expresión mRNA *VDR* en pacientes AR y SC por calcidiol categorizado (suficiencia: categoría de referencia); c) Expresión mRNA *VDR* en pacientes AR y SC por terciles de calcitriol (T1 calcitriol: categoría de referencia). AR= Artritis reumatoide. SC= Sujetos control. Categoría de referencia = 1. Datos expresados en  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  normalizados con mRNA de *GAPDH* como gen de referencia.

Al analizar por categorías de calcidiol las pacientes AR con deficiencia (<20 ng/mL) expresan 21.25 veces más *VDR* comparadas con las pacientes AR con suficiencia ( $\geq 30$  ng/mL). Las que presentaron insuficiencia de calcidiol ( $\geq 20 - 30$  ng/mL) expresan 16.71 veces más *VDR* vs. AR con suficiencia de vitamina D. Las SC con deficiencia expresan 14.28 veces menos comparadas con las SC con suficiencia ( $2^{-\Delta\Delta Cq} = 0.07$ ), así mismo, las SC con insuficiencia expresan 3.33 veces menos comparadas con las SC con suficiencia de vitamina D ( $2^{-\Delta\Delta Cq} = 0.33$ ) (Figura 34b). En cuanto a los niveles de calcitriol, las pacientes con AR ubicadas en el tercil 3 (T3) de calcitriol expresan 1.92 veces menos vs. las AR ubicadas en el T1. Las SC ubicadas en el T3 de calcitriol expresan 5.57 veces más que aquellas SC ubicadas en el T1 de calcitriol (Figura 34c).

Así mismo, se analizó la expresión del gen *RORC* en ambos grupos por genotipo del polimorfismo *TaqI VDR* (Figura 35a), por calcidiol categorizado (Figura 35b) y terciles de calcitriol (Figura 35c).



**Figura 34. Análisis de la expresión mRNA *RORc* pacientes AR y SC.**

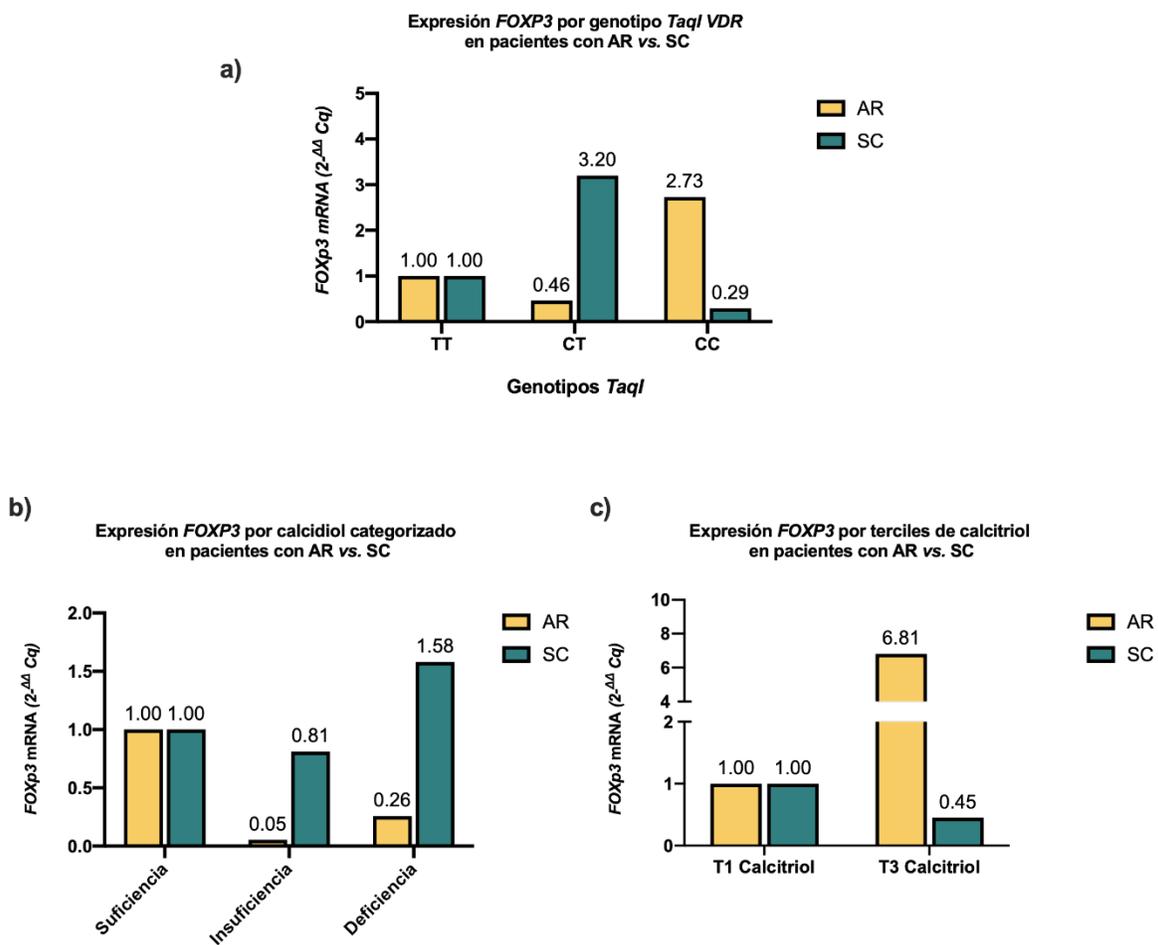
a) Expresión mRNA *RORc* en pacientes AR y SC por genotipo *TaqI* (*TT*: genotipo de referencia); b) Expresión mRNA *VDR* en pacientes AR y SC por calcitriol categorizado (suficiencia: categoría de referencia); c) Expresión mRNA *VDR* en pacientes AR y SC por terciles de calcitriol (T1 calcitriol: categoría de referencia). AR= Artritis reumatoide. SC= Sujetos control. Categoría de referencia = 1. Datos expresados en 2<sup>-ΔΔCq</sup> normalizados con mRNA de *GAPDH* como gen de referencia.

La expresión de *RORc* fue 3.57 veces menor en las pacientes con AR portadoras del genotipo heterocigoto CT vs. aquellas portadoras del genotipo homocigoto silvestre TT (2<sup>-ΔΔCq</sup>= 0.28). Así mismo, las AR portadoras del genotipo CC expresan 2.77 veces más en comparación con las portadoras del genotipo del TT (2<sup>-ΔΔCq</sup>=2.27) (Figura 35a).

En el caso del calcidiol categorizado las AR con deficiencia expresan 1.41 veces menos *RORC* vs. las AR con suficiencia ( $2^{-\Delta\Delta Cq}=0.74$ ). Las pacientes AR con deficiencia expresan 1.35. veces menos en comparación a las que tienen niveles suficientes de calcidiol ( $2^{-\Delta\Delta Cq}= 0.74$ ), de manera contraria las SC con deficiencia de calcidiol expresan 2.49 veces más *RORc* en comparación con las SC con suficiencia de vitamina D (Figura 35b). En cuanto a los terciles de calcitriol, las pacientes AR ubicadas en el T3 expresan 1.8 veces más *RORC* que las AR ubicadas en el T1, así mismo, las SC ubicadas en el T3 expresan 1.5 veces más *RORc* que las ubicadas en T1 (Figura 35c).

Para el caso del gen *FOXP3*, observamos que las AR portadoras del genotipo homocigoto CC expresan 2.73 veces más *FOXP3* que las AR portadoras del genotipo homocigoto silvestre TT y las portadoras del heterocigoto CT expresan 2.17 veces menos *FOXP3* que las AR TT ( $2^{-\Delta\Delta Cq}= 0.46$ ). En el caso de las SC, las portadoras del genotipo CC expresan 3.44 veces menos *FOXP3* ( $2^{-\Delta\Delta Cq}= 0.29$ ) y las SC portadoras del genotipo heterocigoto CT expresan 3.20 veces más *FOXP3* comparadas con las AR portadoras del genotipo homocigoto TT ( $2^{-\Delta\Delta Cq}=3.20$ )(Figura 36a).

Al hacer la comparativa con suficiencia de calcidiol las pacientes AR deficientes de vitamina D expresan 3.8 veces menos *FOXP3* ( $2^{-\Delta\Delta Cq}=0.26$ ) y aquellas con insuficiencia 20 veces menos *FOXP3* ( $2^{-\Delta\Delta Cq}=0.05$ ) al compararlas con las AR con suficiencia de calcidiol. De manera contraria las SC con deficiencia de calcidiol expresan 1.58 veces más *FOXP3* y aquellas con insuficiencia 1.23 veces menos *FOXP3* vs. las SC con suficiencia ( $2^{-\Delta\Delta Cq}=0.81$ )(Figura 36b).

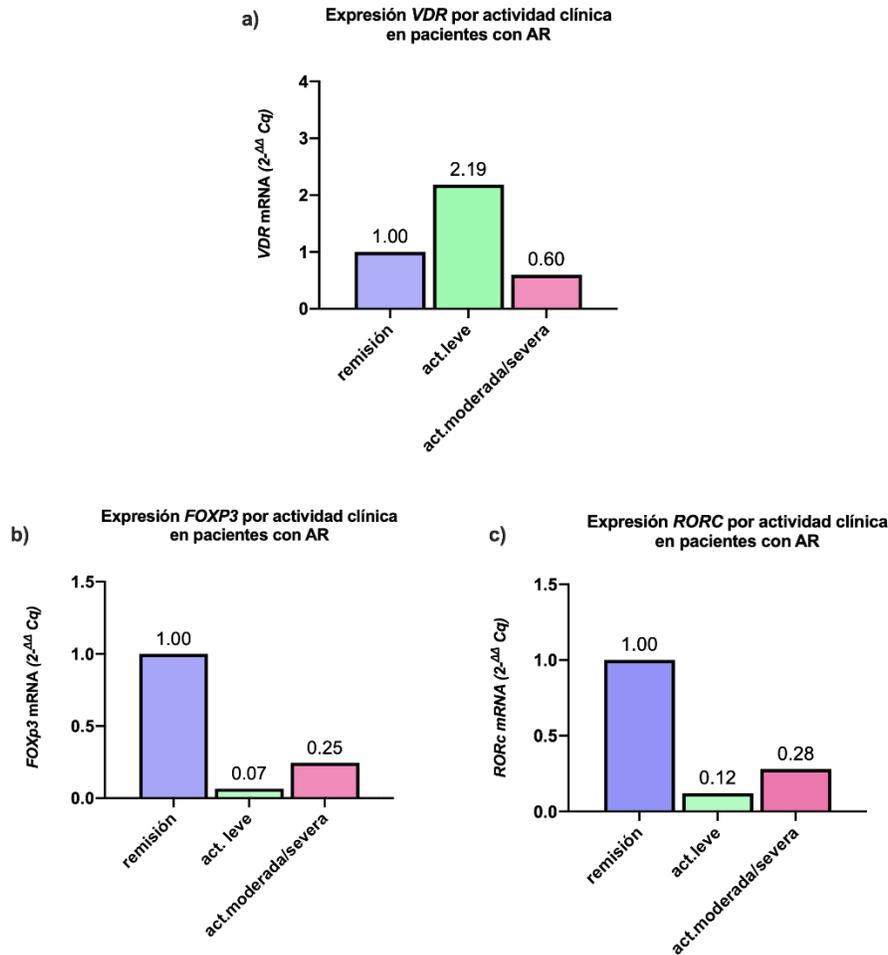


**Figura 35. Análisis de la expresión mRNA *FOXP3* en pacientes AR y SC.**

a) Expresión mRNA *FOXP3* en pacientes AR y SC por genotipo *TaqI* (CC: genotipo de referencia); b) Expresión mRNA *VDR* en pacientes AR y SC por calcitriol categorizado (suficiencia: categoría de referencia); c) Expresión mRNA *VDR* en pacientes AR y SC por terciles de calcitriol (T1 calcitriol: categoría de referencia). AR= Artritis reumatoide. SC= Sujetos control. Categoría de referencia = 1. Datos expresados en  $2^{-\Delta\Delta} Cq$  normalizados con mRNA de *GAPDH* como gen de referencia.

Al hacer la comparativa por terciles de calcitriol, las AR ubicadas en el (T3) expresan 6.81 veces más *FOXP3* que aquellas ubicadas en el tercil uno (T1). Las SC ubicadas en el T3 expresan 2.22 veces menos *FOXP3* en comparación con las SC ubicadas en el T1 de calcitriol ( $2^{-\Delta\Delta} Cq=0.45$ ) (Figura 36c).

Por último, analizamos la expresión del mRNA *VDR*, *FOXP3* y *RORc* por categorías de la actividad clínica en pacientes con AR (Figura 37). Las pacientes AR con actividad moderada/severa expresan 1.93 veces menos *VDR* ( $2^{-\Delta\Delta Cq}=0.05$ ), 4.07 veces menos *FOXP3* ( $2^{-\Delta\Delta Cq}=0.25$ ) y 3.55 veces menos *RORc* ( $2^{-\Delta\Delta Cq}=0.28$ ) que las pacientes AR que están en remisión (Figura 37).

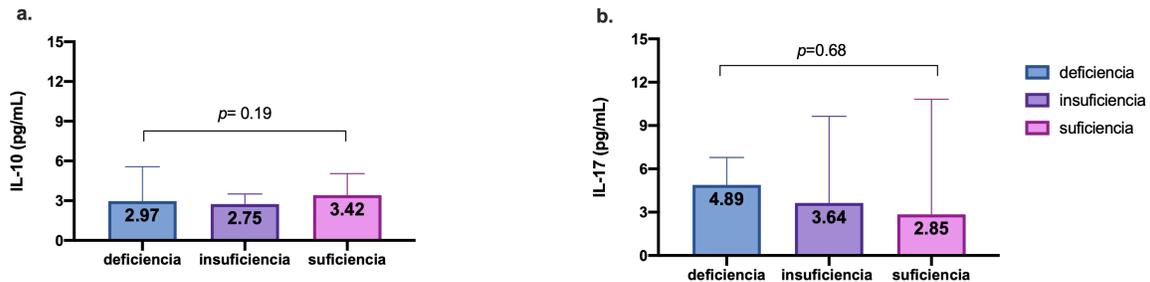


**Figura 36. Análisis de la expresión mRNA *VDR*, *FOXP3* y *RORc* en pacientes con AR.**

a) Expresión mRNA *VDR* en pacientes AR por actividad clínica (remisión: categoría de referencia); b) Expresión mRNA *FOXP3* en pacientes AR por actividad clínica (remisión: categoría de referencia); c) Expresión mRNA *RORc* en pacientes AR por actividad clínica (remisión: categoría de referencia). Categoría de referencia = 1. Datos expresados en  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  normalizados con mRNA de *GAPDH* como gen de referencia.

Por último, se cuantificaron los niveles séricos de IL-10 e IL-17 en una muestra representativa de pacientes con AR (n=80). De forma general observamos que la mediana de IL-17 en las pacientes con AR fue de 3.55 (0.17 – 10.82) pg/mL y para IL-10 fue de 3.18 (0.43 – 19.99) pg/mL.

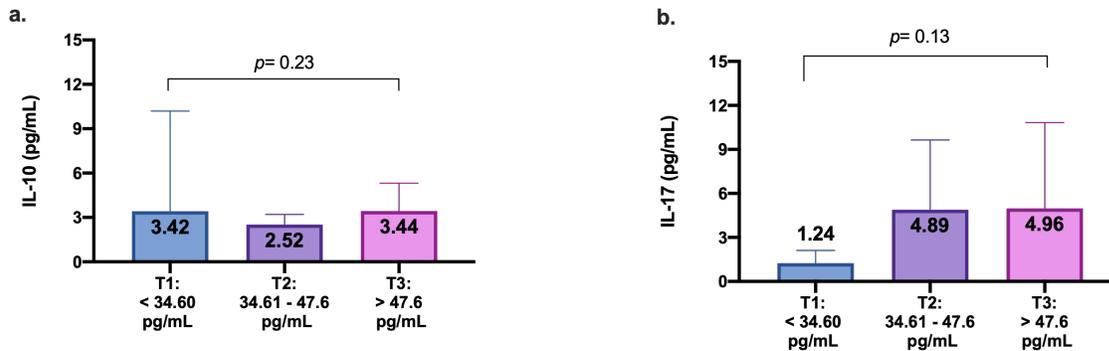
Se realizó el análisis de la concentración de citocinas IL-10 e IL-17 estratificadas por calcidiol categorizado y no observamos diferencia entre las pacientes que presentaron deficiencia, insuficiencia o suficiencia de calcidiol (Figura 38). Sin embargo, en el caso de la IL-17 se aprecia una tendencia a la baja en su concentración conforme se alcanza la suficiencia de calcidiol (Figura 38).



**Figura 37. Niveles séricos de IL-10 e IL-17 estratificados por calcidiol categorizado en pacientes con AR.**

Datos presentados en mediana (p5-p95). Valor de p: prueba *Kruskal-Wallis*. Prueba post-hoc *Dunn's*.

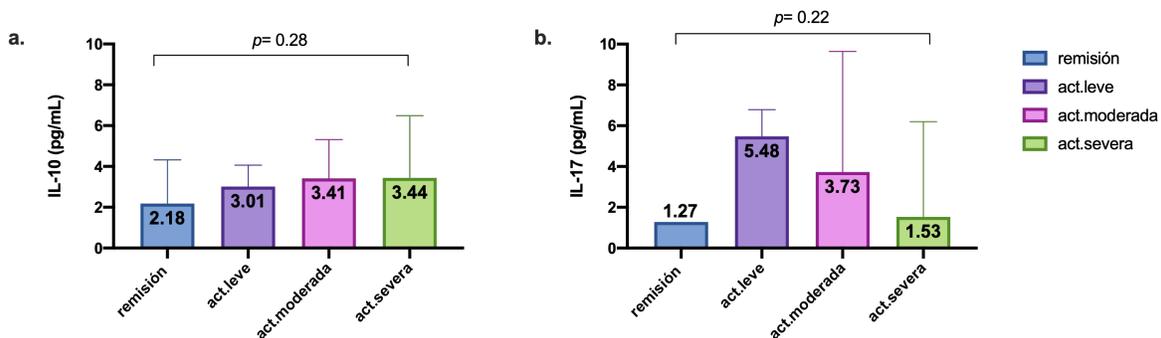
De igual forma, se analizaron los niveles de IL-10 e IL-17 por terciles de calcitriol (Figura 37). En el caso de la IL-10 no se observó diferencia significativa en la concentración entre los terciles 1, 2 y 3 de calcitriol (Figura 39a). Por otra parte, los niveles de IL-17 son mayores cuando se presentan niveles más altos de calcitriol, a pesar de no haber diferencia significativa entre los terciles se puede observar la tendencia (Figura 39b).



**Figura 38. Niveles séricos de IL-10 e IL-17 estratificados por terciles de calcitriol en pacientes con AR.**

Datos presentados en mediana (p5-p95). Valor de p: prueba *Kruskall-Wallis*. Prueba post-hoc *Dunn's*.

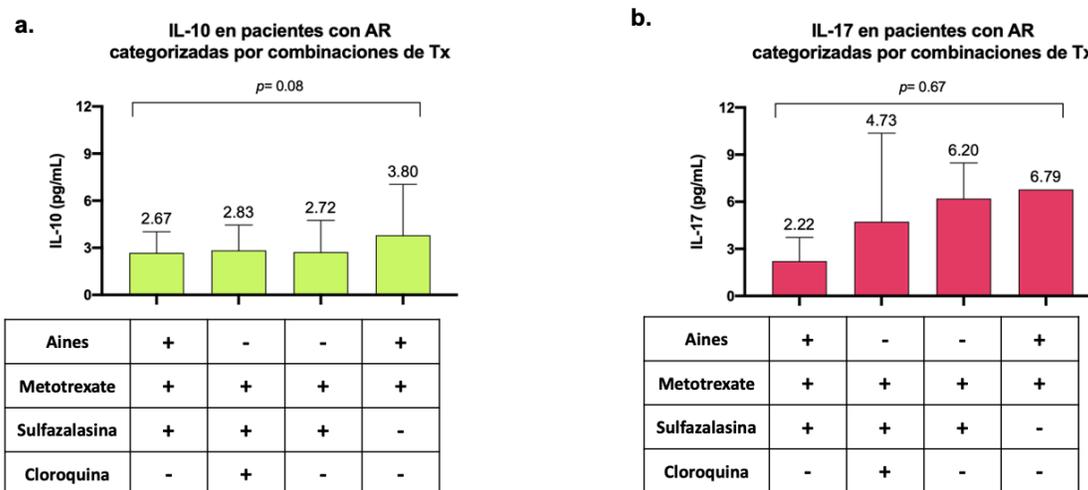
En ese mismo sentido, analizamos las concentraciones de las citocinas entre las distintas categorías de actividad clínica del índice DAS28 (remisión, actividad leve, actividad moderada y actividad severa) (Figura 40). No observamos diferencia significativa entre las distintas categorías para ninguna de las dos citocinas. Sin embargo, se aprecia una tendencia al alza de la IL-10 conforme aumenta la actividad clínica con una mediana de 2.18 pg/mL en remisión, 3.01 pg/mL en actividad leve, 3.41 pg/mL en actividad moderada y 3.44 pg/mL en la actividad severa (Figura 40a). De forma contraria observamos un descenso en la mediana de IL-17 conforme aumenta la actividad clínica de la enfermedad con medianas de 5.48 pg/mL en la actividad leve, 3.73 pg/mL en la actividad moderada y 1.53 pg/mL en la actividad severa (Figura 40b).



**Figura 39. Niveles séricos de IL-10 e IL-17 estratificados por actividad clínica (DAS 28).**

Datos presentados en mediana (p5-p95). Valor de p: prueba *Kruskall-Wallis*. Prueba post-hoc *Dunn's*.

Considerando lo anterior, hipotetizamos que las tendencias observadas pudieran estar influenciadas por el tratamiento administrado durante las distintas etapas de actividad clínica. Por lo tanto, analizamos los niveles de IL-10 e IL-17 categorizadas por las combinaciones de tratamiento más frecuentes en nuestra población de AR. Sin embargo, no se observaron diferencias en la concentración de IL-10 e IL-17 entre las distintas combinaciones de tratamientos (Figura 41).

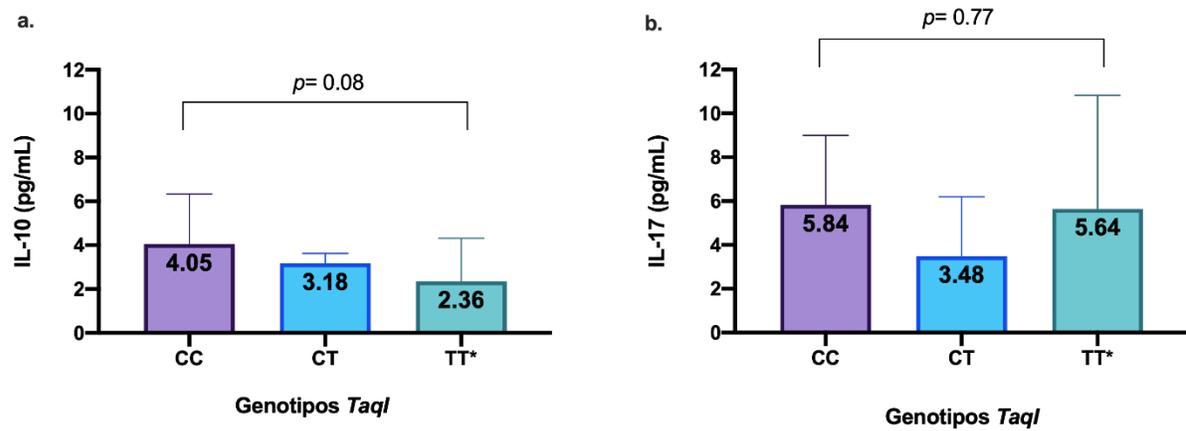


**Figura 40. Niveles séricos de IL-10 e IL-17 categorizadas por las distintas combinaciones de tratamiento farmacológico en las pacientes con AR.**

Datos presentados en mediana (p5-p95). Valor de p: prueba *Kruskall-Wallis*.

Prueba post-hoc *Dunn's*.

Por último, se analizaron las concentraciones de las citocinas IL-10 e IL-17 entre los distintos genotipos del polimorfismo *TaqI* y entre los distintos haplogenotipos observados en nuestra población de estudio. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de las citocinas entre los genotipos de *TaqI* (Figura 41).



**Figura 41. Niveles séricos de IL-10 e IL-17 estratificados por los genotipos del polimorfismo *TaqI*.**

Datos presentados en mediana (p5-p95). Valor de p: prueba *Kruskall-Wallis*. Prueba post-hoc *Dunn's*.

Tampoco se observaron diferencias en las concentraciones de IL-10 e IL-17 entre los distintos haplogenotipos de los polimorfismos *BsmI*, *ApaI* y *TaqI* (Cuadro 28).

**Cuadro 27. Niveles séricos de IL-10 e IL-17 en pacientes con AR categorizados por haplogenotipos de los polimorfismos *BsmI*, *Apal* y *TaqI*.**

Niveles séricos de citocinas IL-10 e IL-17 (pg/mL) de acuerdo a los haplogenotipos			
Haplogenotipo	IL-10 (n = 75)	IL-17 (n = 19)	Valor de p*
GCT/GCT §	2.65 (0.43 – 18.16)	-	-
AAC/GCT	3.08 (0.57 – 15.77)	3.56 (0.17 – 3.73)	0.95
GAT/GCT	2.21 (0.19 – 184.2)	5.64 (0.46 – 10.82)	0.93
AAC/GAT	1.85 (0.14 – 5.57)	3.48 (1.52 – 6.07)	0.37
GAT/GAT	12.83 (10.2 – 15.46)	-	-
GAC/GCT	3.69 (0.91 – 8.35)	4.87 (1.28 – 8.47)	0.8
GCC/GCT	3.08 (0.26 – 29.32)	6.19 (1.04 – 9.65)	0.86
AAC/AAC	4.14 (2.65. - 5.50)	4.88 (4.88 – 4.88)	-
AAC/GCC	3.68 (3.24 – 6.33)	6.78 (0.37 – 8.99)	0.57
Otros	6.17 (3.62 – 35.58)	2.16 (2.11 – 2.22)	0.13
<b>Valor de p#</b>	0.05#	0.96#	

Datos proporcionados en mediana (p5 – p95). \*Prueba *U de Mann Whitney*. #Prueba *Kruskall Wallis*.

## XII. DISCUSIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica inflamatoria que afecta principalmente las articulaciones. Su desarrollo se ha vinculado con factores genéticos y ambientales como el tabaquismo, disbiosis, obesidad, dieta y niveles de vitamina D (Dankers *et al.*, 2017a; Smolen, D. Aletaha, *et al.*, 2018; Illescas-Montes *et al.*, 2019).

Se ha descrito una frecuencia mayor de deficiencia y menores niveles séricos de vitamina D en los pacientes con AR y otras enfermedades autoinmunes comparados con sujetos sanos en distintas poblaciones (Merlino *et al.*, 2004; Celikbilek *et al.*, 2014; He *et al.*, 2016; Meza-Meza *et al.*, 2021).

En este estudio no se ha observado diferencia en los niveles séricos de calcidiol entre los pacientes con AR vs. SC, sin embargo, en ambos grupos la mediana se categoriza con insuficiencia. Así mismo, la deficiencia de vitamina D ha sido más frecuente en los pacientes con AR. Estas diferencias pudieran estar influenciadas por variables como el tiempo de exposición a la luz solar (UVB), la ubicación geográfica, la dieta, el estado nutricional y la presencia de variables genéticas en el receptor de vitamina D (VDR) de los sujetos de estudio (Daniel D. Bikle, 2014; Christakos *et al.*, 2016; Whiting, Calvo and Vatanparast, 2017; Charoenngam, Shirvani and Holick, 2019).

Por otra parte, se ha correlacionado negativamente la actividad clínica de la enfermedad de acuerdo al índice DAS28 con la deficiencia de calcidiol (Azzeh and Kensara, 2015). En nuestra población no observamos correlación entre los niveles séricos de vitamina D y el índice DAS28, sin embargo, al analizar por categorías de actividad clínica (remisión, actividad leve, actividad moderada y actividad severa) observamos una tendencia a la baja de los niveles de calcidiol en los pacientes con actividad severa de la enfermedad y de forma contraria observamos una tendencia al alta en los niveles séricos de calcitriol en los pacientes con actividad severa. De

igual manera, en este estudio las pacientes con AR tienen mayores niveles séricos de calcitriol en comparación a los sujetos control. El calcitriol es la molécula activa de la vitamina D, sin embargo, no es la molécula de interés en la mayoría de los estudios que involucran esta vitamina. Recientemente un estudio en pacientes con lupus eritematoso sistémico publicado por Meza-Meza *et al.*, en el 2022 reportó que existe una correlación negativa entre los niveles séricos de calcidiol y calcitriol, es decir, que conforme aumentan los niveles séricos de calcidiol disminuye el calcitriol sérico (Meza-Meza *et al.*, 2021). Este patrón también se observó en nuestras pacientes con AR, mismo que se observó al calcular la relación de hidroxilación de ng de calcidiol a pg de calcitriol donde las pacientes con AR tienen una relación mayor de hidroxilación en comparación a las SC. Este patrón se ha descrito en otras patologías como insuficiencia renal crónica (IRC) y lupus eritematoso sistémico (LES). Este aumento se ha asociado con la expresión extra-renal de la enzima CYP27B1 por células del sistema inmune (linfocitos T, macrófagos y células dendríticas) y su hiperactivación en enfermedades inflamatorias (Pasquali *et al.*, 2015; Meza-Meza *et al.*, 2021).

Molecularmente el calcitriol es la molécula que interactúa con el receptor de vitamina D (VDR). Esta interacción es esencial para que se lleve a cabo la formación del heterodímero VDR-RXR y este interactúe con los VDRE en el DNA para modular la expresión génica (Kongsbak *et al.*, 2013; Daniel D. Bikle, 2014). VDR es un factor de transcripción dependiente de ligando; por lo tanto, se requieren de niveles séricos suficientes de calcitriol para que pueda ejercer su función. Se ha descrito que en condiciones inflamatorias el principal sustrato de calcitriol es la producción endógena a partir de la hidroxilación de calcidiol por células del sistema inmune y la acción de la enzima CYP27B1 (Jeffery *et al.*, 2012).

El calcitriol sérico contrarregula su producción al inducir la traslocación de los factores de transcripción asociados a CYP27B1 y favorecer la interacción del complejo VDR-RXR a regiones promotoras de la enzima CYP24A1 que degrada al calcitriol, disminuyendo así los niveles séricos del mismo (Kim, Shevde and Pike, 2004). Este mecanismo puede verse mermado en ambientes proinflamatorios como

puede ser la AR. La presencia de citocinas como IFN- $\gamma$  induce la activación del factor de transcripción STAT1, favorece la interacción de STAT1 con los elementos de respuesta a vitamina D e inhibe la interacción con CYP24A1, reflejándose en un aumento de los niveles de calcitriol (Vidal, Ramana and Dusso, 2002; Kongsbak *et al.*, 2013).

Niveles altos de calcitriol en condiciones patológicas pueden indicar un proceso inflamatorio en curso. Por ejemplo, en otras condiciones como enfermedad granulomatosa y tuberculosis pulmonar, se han asociado mayor actividad clínica de la enfermedad. Y en contextos como el cáncer, niveles elevados de calcitriol promueven la inmunosupresión en el microentorno tumoral debido a sus propiedades antiinflamatorias, lo que podría favorecer la progresión del tumor (Barnes *et al.*, 1989; Anisiewicz *et al.*, 2020).

Considerando lo anterior, decidimos realizar análisis de correlación entre las moléculas de vitamina D con variables bioquímicas, niveles de PCR y marcadores de riesgo cardiometabólico.

Curiosamente, observamos una correlación positiva entre la tasa de hidroxilación y la PCR. Los niveles de calcitriol correlacionaron positivamente con la PCR, el índice de Kannel, la relación Tg/HDL-C y el índice de Castelli. Esto sugiere que en pacientes con AR, a medida que aumentan los niveles de calcitriol, también lo hace la pCr. Niveles altos de pCr se asocian con mayor riesgo riesgo cardiovascular. Los pacientes con artritis reumatoide (AR) tienen hasta 2 veces o más riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. Este aumento de riesgo podría atribuirse a factores como la dislipidemia, que se presenta hasta en el 60% de los pacientes con AR, la presencia de diabetes mellitus tipo 2, un índice de masa corporal (IMC) e índice cintura cadera (ICC) elevados, así como la presencia de hipertensión. De manera similar, el ambiente proinflamatorio presente en la AR por sí mismo aumenta el riesgo de enfermedad cardiovascular (Avina-Zubieta *et al.*, 2012; Chung *et al.*, 2013; England *et al.*, 2018). Sin embargo, esto difiere de lo descrito en otros estudios, donde han observado correlación negativa entre los niveles séricos de calcitriol con marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular, como la pCr, TNF- $\alpha$ , ácido úrico, homocisteína y fibrinógeno. Además, se ha descrito un mayor

riesgo de enfermedad coronaria, hipertensión e insuficiencia cardíaca en pacientes con bajos niveles de calcitriol (Zittermann *et al.*, 2009; Saghir Afifeh *et al.*, 2021). Cabe destacar que ninguno de estos estudios se llevó a cabo en pacientes con artritis reumatoide u otras enfermedades autoinmunes.

Por otro lado, estudios *in vitro* han descrito que el calcitriol tiene un efecto dual dependiente de la dosis. Por ejemplo, estudios en condrocitos y queratinocitos han demostrado que la capacidad del calcitriol para estimular o inhibir la proliferación celular está vinculada a su concentración; a concentraciones más altas, la proliferación celular disminuye (Pillai *et al.*, 1995; Klaus *et al.*, 1997). También se ha observado que el calcitriol podría regular otros factores de crecimiento, como la endotelina en cardiomiocitos en un modelo *in vivo* (Wu *et al.*, 1996). La endotelina es un potente vasoconstrictor que se ha asociado con un aumento de la mortalidad en pacientes con y sin enfermedad cardiovascular (Bossard *et al.*, 2015).

Por otro lado, está bien descrito que tener niveles bajos de calcidiol aumenta la mortalidad y el riesgo cardiovascular, así como la concentración de marcadores inflamatorios sistémicos (Dobnig, 2008; Wang *et al.*, 2008; Saghir Afifeh *et al.*, 2021).

Por otra parte, se ha asociado la presencia de variables genéticas en *VDR* (*FokI*, *BsmI*, *Apal* y *TaqI*) con autoinmunidad y niveles séricos de los metabolitos de la vitamina D (calcidiol y calcitriol) (Karray *et al.*, 2012a; Tizaoui and Hamzaoui, 2015; Bizzaro *et al.*, 2017c; Bae and Lee, 2018; Meza-Meza *et al.*, 2022).

En este estudio analizamos la asociación de las variantes polimórficas en *VDR* (*FokI*, *BsmI*, *Apal* y *TaqI*) con los niveles séricos de calcidiol, calcitriol, la susceptibilidad para la artritis reumatoide, la actividad clínica y la expresión de mRNA de *VDR*, *FOXP3* y *RORC*. Antes de hacer los análisis de asociación se verificó que nuestros SC cumplieran con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto con el objetivo de comprobar que la segregación alélica ha sido azarosa (Iniesta, Guinó and Moreno, 2005).

En nuestra población no se observaron diferencias entre las frecuencias alélicas y genotípicas de *FokI*, *BsmI* y *ApaI* así como tampoco se asociaron con mayor riesgo genético para la AR. Esto difiere a lo reportado en otras poblaciones, por ejemplo, en Europa, población de Tunez y Pakistan el polimorfismo *FokI* se asocia con riesgo genético mayor para la AR (Lee *et al.*, 2011; Karray *et al.*, 2012b; Mukhtar *et al.*, 2019). De forma contraria en población turca y mexicana no se ha observado asociación entre los polimorfismos *FokI*, *BsmI* y *ApaI* con la artritis reumatoide, así como en otras enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (Ateş, 2011; Karray *et al.*, 2012b; González-Mercado *et al.*, 2013; Meza-Meza *et al.*, 2022).

Respecto al polimorfismo *TaqI* los genotipos más frecuentes en las pacientes con AR fueron el homocigoto CC (12%) y el heterocigoto CT (51%), mismos que se asociaron con riesgo genético mayor para la AR (OR: 3.45 (1.30 – 9.34),  $p < 0.01$  y OR: 1.8 (1.10 – 3.10),  $p = 0.01$  respectivamente). Así mismo, el alelo T fue el más frecuente en ambas poblaciones (AR= 62% y SC= 74%) y el alelo polimórfico C se asoció con 1.76 veces riesgo genético mayor para la AR (OR= 1.76 (1.22 – 2.53),  $p < 0.01$ ). Estos datos son consistentes con lo reportado previamente en población Iraní y Turca donde el alelo polimórfico C de *TaqI* se asoció con susceptibilidad para la AR (Tizaoui *et al.*, 2014; Kaviani *et al.*, 2019). El polimorfismo *TaqI* esta ubicado en el exón 9 de *VDR*, se caracteriza por presentar un cambio de C>T que no genera modificación en el aminoácido que codifica (Ile); por lo tanto, no altera la proteína que codifica durante la traducción. Sin embargo, al estar ubicado cerca de la región 3' UTR se ha asociado con variabilidad en la estabilidad del mRNA de *VDR* (G Kerr Whitfield *et al.*, 2001).

Siguiendo el contexto de los polimorfismos se calculó el desequilibrio de ligamiento (DL) entre los polimorfismos *FokI*, *BsmI*, *ApaI* y *TaqI* en el gen *VDR* en nuestra población. El desequilibrio ligamiento analiza la probabilidad de que un conjunto de genes ubicados con cercanía en el mismo gen se esten segregando en haplotipo o en conjunto. (Iniesta, Guinó and Moreno, 2005; Slatkin, 2008). Se analizaron 148

muestras de pacientes AR y 201 SC donde los polimorfismos *BsmI*, *ApaI* y *TaqI* se observaron con DL de alto y una  $D' > 0.6$ . De manera contraria *FokI* con una  $D' = 0.1$  no está en desequilibrio de ligamiento con los otros polimorfismos en *VDR*. En población Pakistaní se observaron los 4 polimorfismos de interés (*FokI*, *BsmI*, *ApaI* y *TaqI*) en alto DL ( $D' > 0.06$ ) en pacientes con AR (Mukhtar *et al.*, 2019).

Considerando lo anterior procedimos a analizar las frecuencias haplotípicas y haplogenotípicas de los polimorfismos *BsmI*, *ApaI* y *TaqI*. Un haplogenotipo hace inferencia a la combinación alélica que recibe un organismo diploide de cada padre. En este estudio el haplotipo GCT fue el más frecuente en ambas poblaciones, seguido de AAC, GAC y GAT. Así mismo, los portadores de los haplotipos AAC, GAT y GCC poseen riesgo genético mayor para la AR (OR=1.66,  $p = 0.02$ ; OR=2.0,  $p = 0.001$ ; OR=6.6,  $p < 0.001$ ). Al inferir las frecuencias haplogenotípicas GCT/GCT, AAC/GCT y GAT/GCT fueron los más frecuentes. Se asociaron con susceptibilidad para la enfermedad los haplogenitpos: GAT/GCT y AAC/GAT (OR= 2.9,  $p < 0.01$ ; OR= 4.4,  $p = 0.001$ ) en ambos casos portadores del haplotipo previamente observado como de riesgo. Son pocos los análisis que reportan la frecuencia haplotípica y haplogenotípica de *VDR*. Además la frecuencia de estos va diferir entre poblaciones, sin embargo, un meta-análisis realizado en 2004, reportó que las variables *BsmI* y *TaqI* se presentan en DL fuerte entre distintas poblaciones (Thakkinstian, D'Este and Attia, 2004).

Por otra parte, algunos estudios han asociado la presencia de polimorfismos en *VDR* con los niveles séricos de la vitamina D. En nuestro estudio analizamos las concentraciones de los metabolitos de la vitamina D y la relación calcitriol/calcidiol de acuerdo con los genotipos del polimorfismo *FokI* y los haplogenotipos de los polimorfismos *BsmI*, *ApaI* y *TaqI* que observamos en desequilibrio de ligamiento en nuestras pacientes con artritis reumatoide. En el caso del calcidiol no observamos diferencia en los niveles de calcidiol de acuerdo con los genotipos de *FokI*. De forma contraria observamos que las pacientes con AR presentan mayores niveles de calcitriol independientemente del genotipo del polimorfismo *FokI*.

Respecto a la relación calcitriol/calcediol observamos que las pacientes con AR portadoras de los genotipos CT y TT presentan una relación de hidroxilación mayor comparadas con las pacientes con AR portadoras del genotipo silvestre CC. Otro estudio en pacientes con autoinmunidad reportó mayores niveles séricos de calcediol y mayor relación calcitriol/calcediol en las pacientes portadoras de los genotipos CT y TT del polimorfismo *FokI*. Así mismo describieron el mismo patrón de calcitriol elevado en las pacientes con LES de manera independiente a los genotipos del polimorfismo *FokI* (Meza-Meza *et al.*, 2022).

Al analizar los niveles de calcediol por haplogenotipo de los polimorfismos *BsmI*, *ApaI* y *TaqI* no hubo diferencia entre el grupo de pacientes con AR y SC y los distintos haplogenotipos observados en nuestra población. En el mismo sentido observamos que las pacientes con AR portadoras de los haplogenotipos AAC/GCT y GAT/GCT tienen mayores niveles séricos de calcitriol en comparación con las SC portadoras de los mismos haplogenotipos.

Por otra parte, realizamos analizamos de expresión en ambos grupos de estudio del mRNA de *VDR* y de los factores de transcripción RORC y FOXP3 descritos como los factores de transcripción maestros para los fenotipos celulares Th17 y Treg respectivamente (O'Shea and Paul, 2010).

Al comparar la expresión del mRNA de los genes *VDR*, *RORC* y *FOXP3* en pacientes con AR vs. SC observamos que las pacientes con AR tienen menor expresión de los genes de interés que los SC. Considerando lo anterior analizamos la expresión por genotipo del polimorfismo *FokI*, calcediol categorizado, terciles de calcitriol y actividad clínica de acuerdo con el índice DAS 28 en las pacientes con AR. De acuerdo al genotipo de *FokI* observamos que las pacientes con AR portadoras de los genotipos CT y TT expresan más *VDR* que las portadoras del genotipo silvestre CC. Este aumento en la expresión pudiera estar asociado a un mecanismo de compensación conferido la presencia del alelo T.

El polimorfismo *FokI* está en el exón 2 del gen *VDR*, se caracteriza por presentar un cambio de C>T, esta mutación genera un cambio en el aminoácido que codifica, Thr>Met (Treonina por metionina). Este intercambio modifica el sitio de inicio de la transcripción y genera una variante de la proteína 3 aminoácidos más corta que la variante con el alelo silvestre C (alelo T: *VDR* de 424 aminoácidos y alelo C: *VDR* de 427 aminoácidos) (Uitterlinden, Fang, van Meurs, *et al.*, 2004). Esta variante trunca se ha asociado con mayor capacidad de transactivación a nivel transcripcional, es decir, favorece la unión de factores de transcripción que forman parte de la maquinaria transcripcional como TFIIB, lo que se refleja en una mayor tasa transcripcional de la proteína (Jurutka *et al.*, 2000; G Kerr Whitfield *et al.*, 2001). Así mismo se analizó la expresión de los genes de interés por calcidiol categorizado y observamos que las pacientes con AR que cursan con insuficiencia y deficiencia de vitamina D expresan más *VDR*, menos *RORC* y *FOXP3* que las pacientes con suficiencia de calcidiol. De manera contraria observamos que las pacientes con AR ubicadas en el T3 de calcitriol expresan menos *VDR*, más *RORC* y *FOXP3* que las pacientes AR ubicadas en el T1. Considerando lo anterior y recordando el patrón de niveles más altos de calcitriol observado en las pacientes con AR pudiéramos hipotetizar que estas modificaciones en la expresión de los genes *RORC* y *FOXP3* pudieran estar influenciadas por la vía de señalización no canónica del calcitriol. Previamente se ha descrito la presencia de *VDR* en la membrana de linfocitos, esta vía de señalización desencadena la activación de segundos mensajeros como la proteína disulfuro isomerasa A3 (*PDAI3*) la cual favorece la traslocación al núcleo de factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, STAT1 y STAT3 asociados a la expresión de genes proinflamatorios como IL-1, IL-6 y TNF (Huhtakangas *et al.*, 2004; Zmijewski and Carlberg, 2020). Así mismo, los factores de transcripción STAT1 y STAT3 favorecen la expresión de los factores de transcripción *T-bet* y *RORC* asociados a la polarización de linfocitos hacia un fenotipo Th1 y Th17. Estos fenotipos celulares se caracterizan por la expresión de citocinas proinflamatorias como INF- $\gamma$  e IL-17 asociadas a la actividad clínica de la artritis reumatoide.

Considerando lo anterior, se procedió a cuantificar los niveles séricos de las citocinas IL-10 e IL-17 en los sueros de pacientes. Se ha descrito que la IL-17 tiene un papel importante en la respuesta inflamatoria crónica y el daño tisular en la AR. Promueve la activación de fibroblastos tipo sinoviocitos (FLS), la diferenciación de osteoclastos a través de la sobreexpresión del ligando de receptor activador para el factor nuclear kappa B (RANKL, del inglés *Receptor Activator for Nuclear Factor Kappa B Ligand*), así como el reclutamiento y activación de neutrófilos, macrófagos y linfocitos B en la cápsula sinovial (Lubberts, 2015; Schinocca *et al.*, 2021). Lo anterior favorece el ambiente inflamatorio que en sinergia con otras citocinas como TNF- $\alpha$  inducen la expresión de otros mediadores inflamatorios como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y enzimas metaloproteinasas (MMPs) promoviendo la progresión de la inflamación a un estado crónico de la AR (Lubberts, 2015; Al-Saadany *et al.*, 2016). Por otra parte, también se ha descrito un desbalance en el eje Th17(IL-17)/Treg(IL-10) en el desarrollo y progresión de la AR. La IL-10 en conjunto con TGF- $\beta$  son las citocinas características de los linfocitos Treg. Las células Treg inhiben las funciones efectoras de las células T autoreactivas manteniendo la auto-tolerancia y modulan la respuesta inmune (Wang *et al.*, 2012; Al-Zifzaf *et al.*, 2015).

En este estudio observamos una mediana de 3.56 (0.17 – 10.82) pg/mL de IL-17 en suero de las pacientes con AR. Esto difiere a lo previamente reportado en otras poblaciones con AR donde describen medianas más elevadas de IL-17 desde 97.43 pg/mL hasta 204.6 pg/mL (Al-Saadany *et al.*, 2016; Atwa *et al.*, 2019; Qu,C.-H., Q.-F. Zou., 2019). Así mismo, no observamos diferencia en las concentraciones de IL-17 entre las distintas categorías de la actividad clínica de acuerdo con el índice DAS 28, sin embargo, de forma controversial, observamos una tendencia a la baja en la actividad severa de la enfermedad.

En estudios previos la IL-17 correlaciona positivamente con la actividad clínica de la AR, así como con marcadores inflamatorios como PCR y VSG (Al-Saadany *et al.*, 2016; Qu,C.-H., Q.-F. Zou., 2019) patrón que nosotros no encontramos en nuestra población de estudio.

En el caso de la IL-10, al analizar por actividad clínica no observamos diferencia entre las cuatro categorías del índice DAS 28, no obstante, observamos una tendencia al alza de IL-10 conforme aumenta la actividad clínica de la enfermedad.

Este patrón se ha observado previamente en otra población con AR donde las pacientes en remisión de la enfermedad presentaron una media de  $195.4 \pm 32.7$  pg/mL de IL-10 y las pacientes con actividad de la enfermedad una media de  $225.6 \pm 47.9$  pg/mL (Wang *et al.*, 2012). Sin embargo, estos resultados son controversiales ya que se ha descrito en distintos estudios una correlación negativa entre la IL-10 y la actividad clínica de la AR, así como una concentración mayor de células Treg en suero y líquido sinovial de pacientes con AR vs. proporciones más bajas de células Treg en pacientes con actividad de la AR (Lawson *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012; Al-Zifzaf *et al.*, 2015). Estas discrepancias pueden explicarse por las distintas subpoblaciones que existen de células Treg. Las subpoblaciones Treg se clasifican de acuerdo a la expresión de marcadores de membrana, factores de transcripción y secreción de citocinas de la siguiente manera: 1. Células Treg en reposo ( $CD45RA^+FoxP3^{low}(CD25^{low})$ ), 2. Células Treg activas ( $CD45RA^-FoxP3^{high}(CD25^{high})$ ) ambas con capacidad inmunosupresora y 3. Células T no reguladoras ( $CD45RA^-FoxP3^{low}(CD25^{low})$ ) que de forma contraria carecen de capacidad supresora y secretan IL-2 e INF- $\gamma$  (Lawson *et al.*, 2006; Suen and Chiang, 2012; Lucca and Dominguez-Villar, 2020). Así mismo, las células  $CD4^+$  Treg también se diferencian por su origen. Las células Treg naturales se originan en el timo durante la maduración. Su fenotipo es  $CD4^+CD25^+ICOS^+FoxP3^+$ , poseen capacidad supresora que ejercen a través de la expresión de IL-10 y TGF- $\beta$  para suprimir la función de las células dendríticas y células T (Ito *et al.*, 2008; Suen and Chiang, 2012). Por lo tanto, estas variaciones observadas tanto en las concentraciones de IL-10 como en la expresión de FOXP3 en el presente estudio podrían estar dadas por el tipo de células Treg que están presentes en nuestra población. Sin embargo, se requiere de la exploración de marcadores de membrana para identificar el fenotipo de este análisis que no realizamos en este estudio.

Por otra parte, analizamos los niveles de las citocinas por calcidiol categorizado, es decir, por deficiencia, insuficiencia y suficiencia de vitamina D y por terciles de calcitriol. En este estudio no observamos diferencia significativa en las concentraciones de IL-10 e IL-17 estratificadas por calcidiol categorizado ni por los terciles de calcitriol. Sin embargo, observamos que conforme se alcanza la suficiencia de calcidiol los niveles de IL-17 disminuyen. Este patrón previamente se había descrito en otra población con AR donde se encontró una correlación negativa entre los niveles séricos de vitamina D e IL-17, es decir, a menores niveles de vitamina D mayor concentración del IL-17 (Saleh, Alaa A., Al-Ali Shereen., 2022). Este patrón pudiera estar dado por la capacidad del calcitriol para regular la expresión de genes asociados al sistema inmune. Donde en un contexto homeostático, los niveles séricos suficientes de vitamina D favorecen la expresión de factores de transcripción como FOXP3 e IL-10 y en un contexto inflamatorio y deficiente de vitamina D se favorece la expresión moléculas proinflamatorias de RORc e IL-17 (Lubberts, 2015; Dankers *et al.*, 2017b; Schinocca *et al.*, 2021).

Al evaluar la concentración de citocinas IL-10 e IL-17 por categorías de la actividad clínica, controversialmente observamos una tendencia al alta en la expresión de IL-10 y a la baja de IL-17 en las pacientes con actividad severa de la enfermedad. Otro estudios realizados en pacientes con AR también han observado la misma tendencia, niveles eleados de IL-10 conforme aumenta la actividad clínica de la enfermedad, e incluso han descrito una correlación positiva entre los niveles de IL-10 con las concentraciones séricas de autoanticuerpos como el factor reumatoide y los anticuerpos anti-péptidos citrulinados (Cush *et al.*, 1995; Hernández-Bello *et al.*, 2017). La IL-10 se ha descrito como una citocina antiinflamatoria producida por distintas células del sistema inmune, como los macrófagos, células T cooperadoras y células B. Sin embargo, en el contexto de autoinmunidad se ha descrito que la IL-10 tiene un rol paradójico tratando de suprimir la expresión de citocinas proinflamatorias que favorece la maduración de células B a células plasmáticas, lo que se refleja en una producción mayor de autoanticuerpos manteniendo activo el proceso inflamatorio (Saxena *et al.*, 2015). En el caso de la IL-17 en otras

poblaciones con AR se ha observado que los niveles de IL-17 correlacionan positivamente con la actividad clínica de la enfermedad (Al-Saadany *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019; Farag *et al.*, 2020). La IL-17 es una citocina proinflamatoria asociada al desarrollo de la AR, que es secretada por las células Th17, células TCD8<sup>+</sup> y por células T $\gamma\delta$ . Su expresión se relaciona con procesos inflamatorios que a su vez inducen la activación de enzimas metaloproteinasas, así como con el reclutamiento de células inmunes como neutrófilos y monocitos, lo que desencadena la expresión de otras citocinas proinflamatorias en los sitios de inflamación (Shahrara *et al.*, 2009; Al-Saadany *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2019; Farag *et al.*, 2020). Sin embargo, los niveles bajos observados en nuestras pacientes con actividad severa podrían estar asociados al uso de fármacos antireumáticos modificadores de la enfermedad (FARMES) como el metotrexato. Estudios *in vitro* han descrito que el Metotrexato (MTX) inhibe de forma dosis-dependiente la interacción entre los fibroblastos tipo sinoviocitos y los linfocitos T, esto se asocia con la inhibición en la expresión de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-17. También el uso de MTX inhibe la degradación y fosforilación de la subunidad I $\kappa$ B $\alpha$ , por lo tanto impide la traslocación al núcleo de NF- $\kappa$ B y se inhibe la expresión de genes proinflamatorios (Majumdar and Aggarwal, 2001; Miranda-Carús *et al.*, 2004). En conclusión, el uso a largo plazo de MTX podría asociarse con reducción en la expresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-12, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-6 e IL-17 (Wessels, Huizinga and Guchelaar, 2007). Cabe destacar que todas nuestras pacientes con actividad severa de la enfermedad tenían MTX como parte de su tratamiento farmacológico.

Una limitante de este estudio es que fue tipo transversal; por lo tanto, no podemos determinar causalidad respecto a lo observado. En este caso nos limitamos a determinar si había o no una asociación. Sin embargo, este estudio es el primero en evaluar la relación entre los polimorfismos en *VDR* con la expresión de su mRNA, niveles séricos de calcidiol, calcitriol, sVDR y con la expresión de los perfiles Th17 y Treg en pacientes con artritis reumatoide (AR) del occidente de México.

### **XIII. CONCLUSIÓN GENERAL**

Las pacientes con AR deficientes de vitamina D presentaron hidroxilación y niveles de calcitriol mayores que correlacionaron positivamente con la pCr y sVDR. Además, las pacientes con niveles elevados de calcitriol presentaron una expresión mayor de *FOXP3*, *RORc* y concentraciones altas de IL-10 e IL-17.

Así también, la presencia del alelo C del polimorfismo *TaqI* en *VDR* se asoció con susceptibilidad mayor para la enfermedad.

#### **XIV. PERSPECTIVAS**

Como perspectivas de este estudio podría considerarse evaluar otras moléculas que también modulan las concentraciones de la vitamina D como: niveles séricos de colecalciferol, hormona paratiroidea (PTH) y calcio sérico. Así mismo, podría evaluarse la presencia de otras variantes genéticas en genes clave del metabolismo de la vitamina D como: *CYP2R1*, *CYP27B1*, *CYP24A1*, *DHCR7* y en *(GC)*. Además de evaluar la presencia de la variante genética *singlet A* en *VDR*, los niveles citoplasmáticos de *VDR*, así como identificar su presencia en la membrana celular de células del sistema inmune y por último, analizar la cantidad de las células Th17 y Treg por medio de citometría de flujo en suero de pacientes con AR.

## XV. PRODUCTOS OBTENIDOS

Publicación de 4 artículos de coautoría, 1 artículo de revisión de primer autor, presentaciones en congresos nacionales e internacionales y participación en eventos de divulgación.



Review

### Nutritional Approaches to Modulate the Cardiovascular Disease Risk in Systemic Lupus Erythematosus Patients: A Critical Literature Review

Karen Pesqueda-Cendejas <sup>1,2,3,4</sup>, Melissa Rivera-Escoto <sup>1,2,4,1</sup>, Mónica R. Meza-Meza <sup>1,2,4</sup>, Bertha Campos-López <sup>1,2,5</sup>, Isela Parra-Rojas <sup>1,4</sup>, Margarita Montoya-Buelna <sup>1,7</sup> and Ulises De la Cruz-Mosso <sup>1, 2, 3, 4, 8</sup>



Article

### Vitamin D Receptor (VDR) Genetic Variants: Relationship of FokI Genotypes with VDR Expression and Clinical Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus Patients

Mónica R. Meza-Meza <sup>1,2</sup>, Barbara Vizmanos <sup>1,3</sup>, Melissa Rivera-Escoto <sup>1,2</sup>, Adolfo I. Ruiz-Ballesteros <sup>1,2</sup>, Karen Pesqueda-Cendejas <sup>1,2</sup>, Isela Parra-Rojas <sup>1,4</sup>, Margarita Montoya-Buelna <sup>1,5</sup>, Sonia Luquín <sup>2</sup>, Bertha Campos-López <sup>1,2</sup>, Paulina E. Mora-García <sup>1,2</sup>, Sergio Cerpa-Cruz <sup>6</sup> and Ulises De la Cruz-Mosso <sup>1,2,\*</sup>



Article

### CRP Serum Levels Are Associated with High Cardiometabolic Risk and Clinical Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus Patients

Karen Pesqueda-Cendejas <sup>1,2</sup>, Isela Parra-Rojas <sup>1,3</sup>, Paulina E. Mora-García <sup>1,2</sup>, Margarita Montoya-Buelna <sup>1,4</sup>, Adolfo I. Ruiz-Ballesteros <sup>1,2</sup>, Mónica R. Meza-Meza <sup>1,2</sup>, Bertha Campos-López <sup>1,2</sup>, Melissa Rivera-Escoto <sup>1,2</sup>, Barbara Vizmanos-Lamotte <sup>1,2</sup>, Sergio Cerpa-Cruz <sup>5</sup> and Ulises de la Cruz-Mosso <sup>1,2,\*</sup>

## Nutritional, biochemical, and clinical determinants of hyperuricemia in systemic lupus erythematosus patients: Relationship with clinical and renal disease activity

Lupus  
2022, Vol. 0(0) 1–14  
© The Author(s) 2022  
Article reuse guidelines:  
[sagepub.com/journals-permissions](https://sagepub.com/journals-permissions)  
DOI: [10.1177/09612033221146923](https://doi.org/10.1177/09612033221146923)  
[journals.sagepub.com/home/lup](https://journals.sagepub.com/home/lup)  


Bertha Campos-López<sup>1,2</sup>, Mónica R Meza-Meza<sup>1,2</sup>, Karen Pesqueda-Cendejas<sup>1,2</sup>, Adolfo I Ruiz-Ballesteros<sup>1,2</sup>, Melissa Rivera-Escoto<sup>1,2</sup>, Juan M Vargas-Morales<sup>1,3</sup>, Isela Parra-Rojas<sup>1,4</sup>, Paulina E Mora-García<sup>1,4</sup>, Barbara Vizmanos<sup>1</sup>, Margarita Montoya-Buelna<sup>1,5</sup>, Sergio Cerpa-Cruz<sup>6</sup> and Ulises De la Cruz-Mosso<sup>1,2</sup> 

Clinical Rheumatology  
<https://doi.org/10.1007/s10067-022-06430-6>

ORIGINAL ARTICLE

3.650 (2021)  
Impact factor

### Association of –717 A > G (rs2794521) CRP polymorphism with high cardiovascular risk by C-reactive protein in systemic lupus erythematosus patients

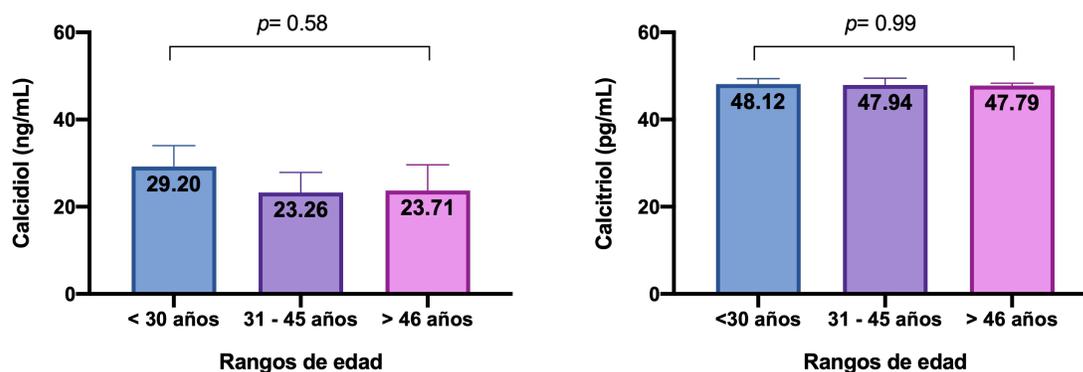
Karen Pesqueda-Cendejas<sup>1,2</sup>  · Isela Parra-Rojas<sup>1,3</sup>  · Mónica R. Meza-Meza<sup>1,2</sup>  · Paulina E. Mora-García<sup>1,2</sup>  · Bertha Campos-López<sup>1,2</sup>  · Adolfo I. Ruiz-Ballesteros<sup>1,2</sup>  · Margarita Montoya-Buelna<sup>1,4</sup>  · Melissa Rivera-Escoto<sup>1,2</sup>  · José M. Moreno-Ortiz<sup>5</sup>  · Luis A. Bautista-Herrera<sup>6</sup>  · Sergio Cerpa-Cruz<sup>7</sup>  · Ulises De la Cruz-Mosso<sup>1,2</sup> 

Received: 10 May 2022 / Revised: 7 October 2022 / Accepted: 28 October 2022  
© The Author(s), under exclusive licence to International League of Associations for Rheumatology (ILAR) 2022

## XVI. RESULTADOS COMPLEMENTARIOS

A continuación, se describe una serie de resultados obtenidos durante el trayecto del proyecto de investigación. La mayoría no presenta diferencias significativas entre grupos o categorías.

Como primer resultado complementario se analizaron los niveles séricos de calcidiol y calcitriol por grupos etarios o rangos de edad (<30 años, 31 - 45 años y > 46 años) con el objetivo de observar si conforme avanza la edad se alteran las concentraciones de los metabolitos de la vitamina D. Sin embargo, no observamos diferencia en el calcidiol y el calcitriol entre los distintos rangos de edad que se estratifico (Figura suplementaria 1).



**Figura suplementaria 1. Niveles séricos de calcidiol y calcitriol estratificados por grupos etarios en pacientes con AR.**

Datos presentados en mediana (p5-p95). Valor de p: prueba *Kruskal-Wallis*.  
Prueba post-hoc *Dunn's*.

Así mismo, realizamos el análisis del calcidiol categorizado por rangos de edad (Cuadro suplementario 1) y observamos que la deficiencia de calcidiol (<20 ng/mL) prevalece en el 22% de las pacientes con AR menores a 30 años, 39% en aquellas que tienen entre 31 – 45 años y en un 37% de las pacientes mayores de 46 años. Respecto a la suficiencia, el 44 % de las pacientes menores a 30 años tiene niveles mayores a 30 ng/mL de calcidiol, así como solo el 30% de las que tienen entre 31 y 45 años de edad y por último el 34% de las pacientes mayores a 46 años.

**Cuadro suplementario 1. Calcidiol categorizado por rangos etarios en pacientes con AR.**

Edad categorizada pacientes con AR				
Calcidiol categorizado	< 30 años %(n)	31 – 45 años %(n)	> 46 años % (n)	Valor de p*
Deficiencia <20 ng/mL	22 (2)	39 (18)	37 (27)	0.89
Insuficiencia ≥ 20-30 ng/mL	33 (3)	30 (14)	29 (21)	
Suficiencia ≥ 30 ng/mL	44 (4)	30 (14)	34 (25)	

Datos presentados en % (n). \*Valor de p= Prueba  $\chi^2$

Respecto al análisis de los terciles de calcitriol por rangos etarios, no observamos diferencia entre los terciles de calcitriol y los tres rangos de edad considerados (Cuadro suplementario 2).

**Cuadro suplementario 2. Terciles de calcitriol por rangos etarios en pacientes con AR.**

Edad categorizada pacientes con AR				
Terciles de calcitriol	< 30 años %(n)	31 – 45 años %(n)	> 46 años % (n)	Valor de p
T1: <34.60 pg/mL	0 (0)	10 (3)	9 (4)	0.94
T2: 34.61 – 47.6 pg/mL	43 (3)	39 (12)	38 (18)	
T3: > 47.61 pg/mL	57 (4)	51 (16)	53 (25)	

Datos presentados en % (n). Valor de p= Prueba  $\chi^2$

Otro análisis realizado respecto a los niveles de calcidiol y calcitriol fue considerando la suplementación con calcitriol para observar si el consumo de un suplemento se asociaba con los niveles séricos de calcidiol y calcitriol en nuestros grupos de estudio. Primero observamos que solo el 3% de las pacientes con AR menores de 30 años, 39% de las pacientes entre 31 – 45 años y 43% de las pacientes mayores de 46 años no consumen un suplemento de calcitriol vs. 3%, 27% y 70% que si consumen algún suplemento de calcitriol respectivamente ( $p=0.25$ ) (Cuadro suplementario 3).

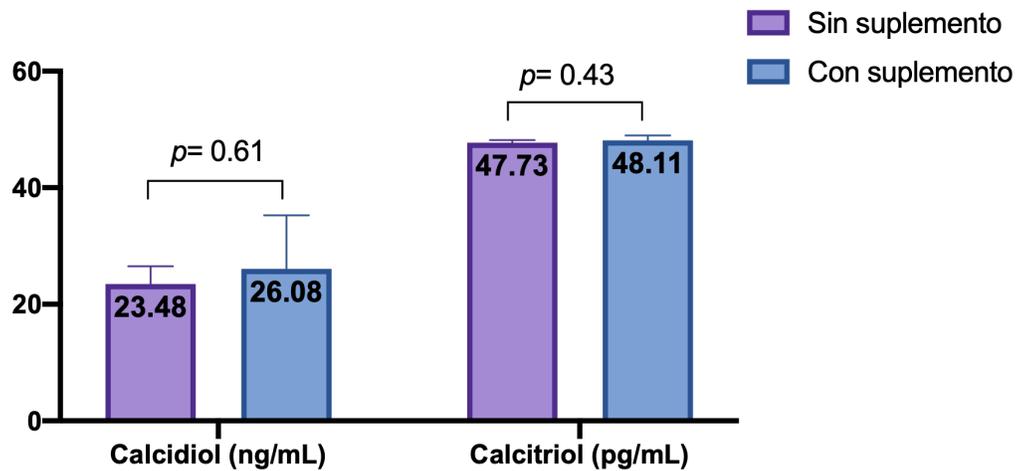
**Cuadro suplementario 3. Suplementación con vitamina D por grupos etarios en pacientes con AR.**

<b>Suplementación con vitamina D por grupos etarios en pacientes con AR</b>				
	<b>&lt; 30 años</b>	<b>31 – 45 años</b>	<b>&gt; 46 años</b>	<b>Valor de p*</b>
	<b>%(n)</b>	<b>%(n)</b>	<b>% (n)</b>	
Sin suplemento % (n)	8 (8)	39 (39)	43 (54)	0.25
Con suplemento %(n)	3 (1)	27 (8)	70 (21)	

\*Datos presentados en % (n). Valor de p= Prueba  $\chi^2$

En ese mismo sentido analizamos los niveles séricos de calcidiol entre las pacientes AR que se suplementan vs. las que no se suplementan y no observamos diferencia significativa entre ambos grupos (23.48 (9.38 – 50.3 vs. 26.08 (10.01 – 53.87),  $p=0.61$ ). En el caso del calcitriol tampoco se encontró diferencia entre los pacientes que consumen suplemento y los que no se suplementan con vitamina D (47.73 (32.75 – 54.63) vs. 48.15 (22.56 – 59.46),  $p= 0.43$ ) (Figura suplementaria 2).

## Calcidiol y calcitriol estratificados por suplementación de vitamina D



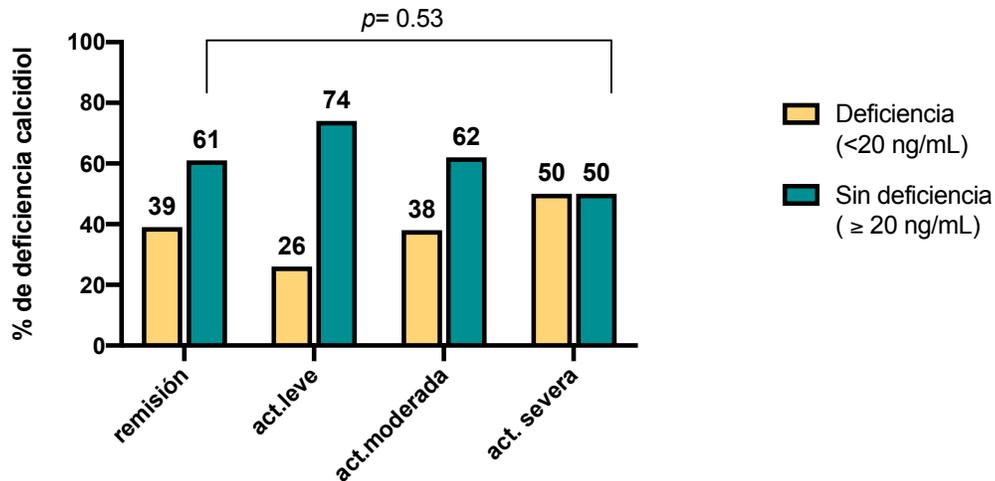
**Figura suplementaria 2. Niveles séricos de calcidiol y calcitriol estratificados por pacientes AR con suplemento y sin suplemento de vitamina D.**

Datos presentados en mediana (p5-p95). Valor de p: prueba *Kruskal-Wallis*. Prueba post-hoc *Dunn's*.

También se analizó la frecuencia de la deficiencia de calcidiol categorizada por actividad clínica de la enfermedad. Se consideraron 2 categorías: niveles séricos <20 ng/mL se clasificaron como deficiencia y niveles  $\geq 20$  ng/mL se categorizaron como sin deficiencia (Figura suplementaria 3).

Aunque no hay diferencia significativa en la frecuencia de la deficiencia y no deficiencia entre las distintas categorías del índice DAS28, si observamos que la frecuencia de deficiencia va aumentando conforme aumenta la actividad clínica de la enfermedad, con un 26% de pacientes con deficiencia en la actividad leve, 38% en la actividad moderada y hasta el 50% de las pacientes con actividad severa de la enfermedad presentan deficiencia de calcidiol (Figura suplementaria 3).

**% deficiencia de pacientes AR con y sin deficiencia de vitamina D categorizados por actividad clínica (DAS28)**



**Figura suplementaria 3. Porcentaje de pacientes AR con y sin deficiencia de vitamina D categorizados por actividad clínica (DAS 28).**

Datos presentados en %. Valor de p: prueba  $\chi^2$

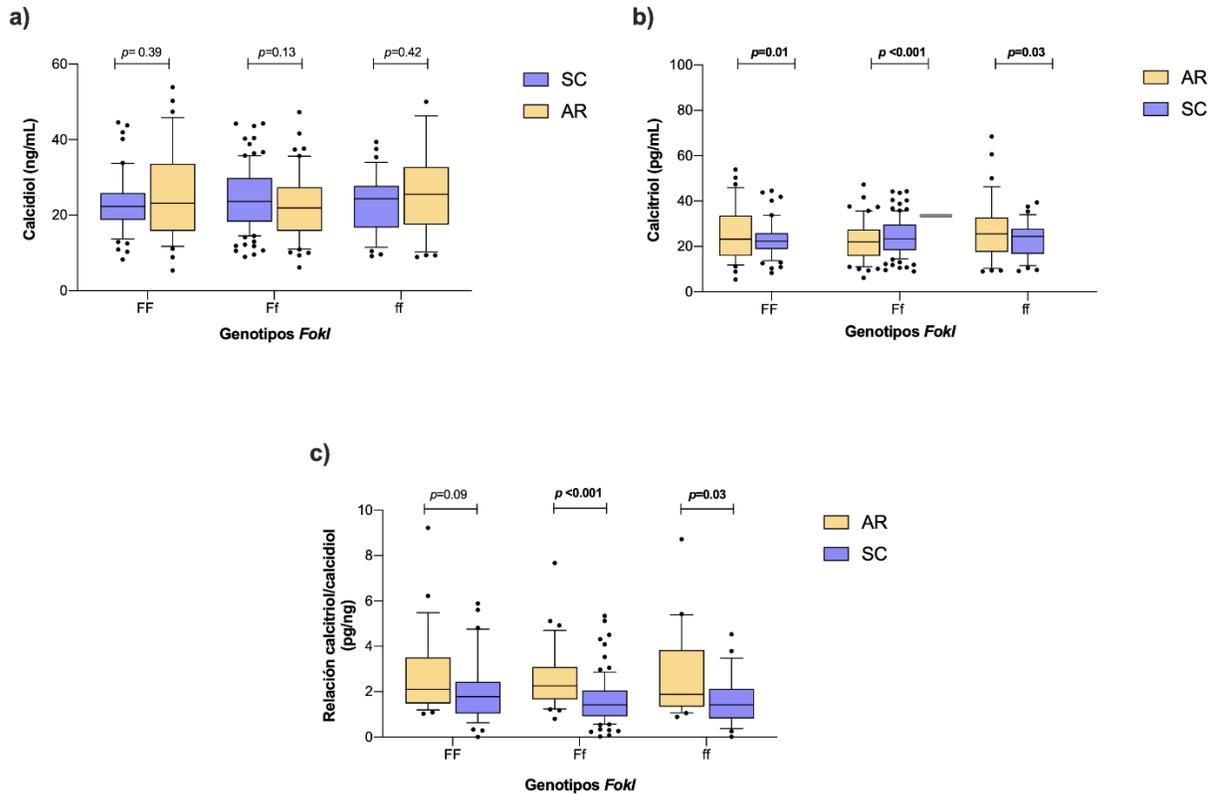
Debido a que el tiempo de exposición a la luz solar es una variable que puede influir sobre los niveles séricos de los metabolitos de la vitamina D, se analizaron los niveles séricos de calcidiol (ng/mL) y calcitriol (pg/mL) categorizados por terciles del tiempo de exposición a la luz UV en minutos de exposición (T1: 0 -30 min, T2: 30.1 - 60 min y T3: 60.1 – 420 min). No se observó diferencia en los niveles séricos de calcidiol en ambos grupos estratificados por terciles de tiempo de exposición al sol, por lo tanto podemos inferir que en nuestro estudio el tiempo de exposición al sol no influye en las concentraciones de calcidiol. En relación con el calcitriol, observamos que todas las pacientes con AR tienen niveles séricos más elevados de calcitriol que las SC independientemente del tiempo de exposición al sol y conforme incrementa el tiempo de exposición a la luz UV no se observan una relación significativa con el incremento de los niveles séricos de calcidiol o calcitriol (Cuadro suplementario 4).

**Cuadro suplementario 4. Niveles séricos de calcidiol y calcitriol estratificados por terciles de minutos de exposición al sol en pacientes con AR y SC.**

Minutos de exposición al sol	Calcidiol (ng/mL) <sup>a</sup>		Valor de p*	Calcitriol (pg/mL) <sup>a</sup>		Valor de p*
	AR	SC		AR	SC	
<b>T1: 0 -30 min</b>	25.26 (8.88 – 63.41)	22.02 (10.62 – 36.93)	0.17*	<b>48.35</b> (31.61 – 58.63)	<b>34.39</b> (1.42– 90.77)	<b>0.001*</b>
<b>T2: 30.1 – 60 min</b>	29.67 (11.38 – 48.48)	22.41 (10.77 – 43.73)	0.06*	<b>46.64</b> (30.22 – 52.72)	<b>38.70</b> (9.28 – 111.5)	<b>&lt; 0.01*</b>
<b>T3: 60.1 – 420 min</b>	18.93 (6.43 – 58.39)	24.67 (14.71 – 41.55)	0.09*	<b>47.63</b> (22.56 – 72.75)	<b>34.78</b> (15.16 – 123.8)	<b>0.03*</b>
<b>Valor de p<sup>†</sup></b>	0.10 <sup>†</sup>	0.33 <sup>†</sup>		0.37 <sup>†</sup>	0.46 <sup>†</sup>	

<sup>a</sup> Datos expresados en mediana (p5 – p95). <sup>†</sup>Prueba *Kruskall-Wallis*. \*Prueba *U de Mann Whitney*.

Por otra parte, se analizaron los niveles séricos de calcidiol (ng/mL), calcitriol (pg/mL) y la relación calcitriol/calcidiol (pg/ng) de acuerdo con el genotipo *FokI* en *VDR* en ambos grupos de estudio (Figura suplementaria 4). Se observó que las SC portadoras del genotipo heterocigoto CT poseen niveles séricos mayores de calcidiol vs. las pacientes con AR portadoras del mismo genotipo (SC: 24.09 (11.82 – 40.21) ng/mL vs. AR: 22.26 (9.72 – 39.44) ng/mL) (Figura suplementaria 4a). En el caso del calcitriol las pacientes con AR presentaron niveles séricos mayores (CC: 47.1 (35.5 - 52.8) pg/mL; CT: 47.93 (32.91 – 59.46) pg/mL y TT: 47.79 (31.32 – 49.86) pg/mL) vs. SC (CC: 40.04 (12.5 – 107.3) pg/mL; CT: 35.21 (8.92 – 67.68) pg/mL y TT: 34.92 (5.6 – 76.07) pg/mL) (Figura suplementaria 4b).



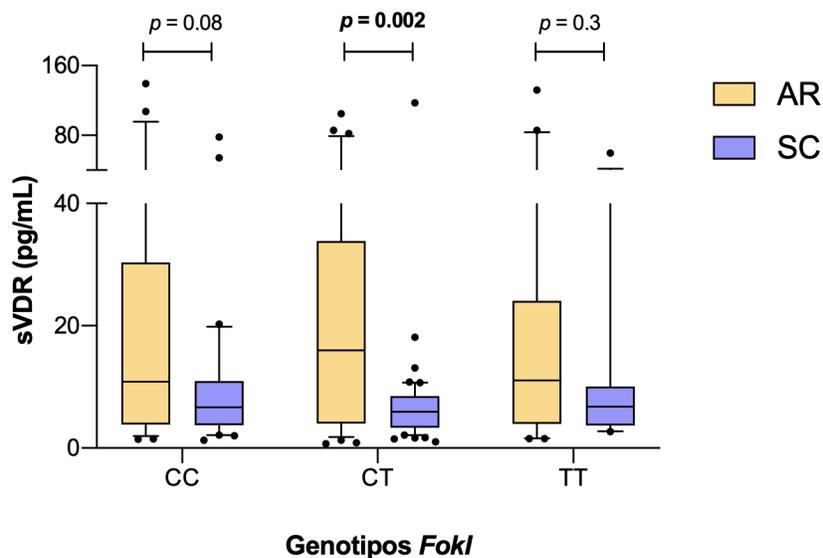
**Figura suplementaria 4. Niveles séricos de calcidiol (ng/mL), calcitriol (pg/mL) y relación calcitriol/calcidiol (pg/mL/ng/mL) categorizados por los genotipos del polimorfismo FokI VDR en pacientes con artritis reumatoide (AR) y sujetos control (SC).**

Datos proporcionados en mediana (p10 – p90). Prueba *U de Mann Whitney*.

También se analizó la relación calcitriol/calcidiol por genotipos *FokI* en ambos grupos de estudio. Se observó que las pacientes con AR portadoras del genotipo CT tienen un patrón de hidroxilación de vitamina D mayor en comparación con las SC portadoras del mismo genotipo (2.25 (1.16 – 5.24) pg/ng vs. 1.42 (0.3 – 4.21) pg/ng,  $p<0.001$ ). El mismo caso con las portadoras del genotipo TT del grupo AR con una relación calcitriol/calcidiol de 1.88 (1.070 – 5.38) pg/ng vs. 1.42 (0.37 – 3.48) pg/mL/ng/mL de las SC ( $p=0.03$ )(Figura suplementaria 4c).

Por otra parte, se analizaron los niveles séricos de sVDR (pg/mL) de acuerdo con los genotipos de *FokI VDR* en ambos grupos, se observó que las pacientes con AR portadoras del genotipo heterocigoto CT poseen mayores niveles de sVDR en

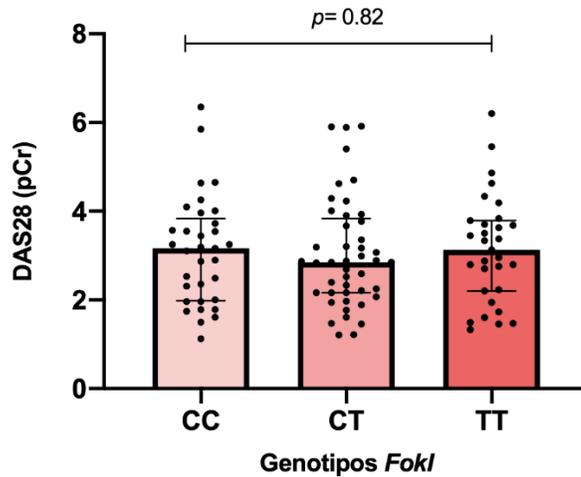
comparación con los SC portadores del mismo genotipo (AR: 18.32 (1.07 – 225.8) pg/mL vs. SC: 6.14 (1.65 – 117.2) pg/mL) (Figura suplementaria 5).



**Figura suplementaria 5. Niveles de sVDR estratificados por genotipo del polimorfismo FokI VDR en pacientes con artritis reumatoide (AR) y sujetos control (SC).**

Datos proporcionados en mediana (p5 - p95).\*\*Prueba U de Mann Whitney.

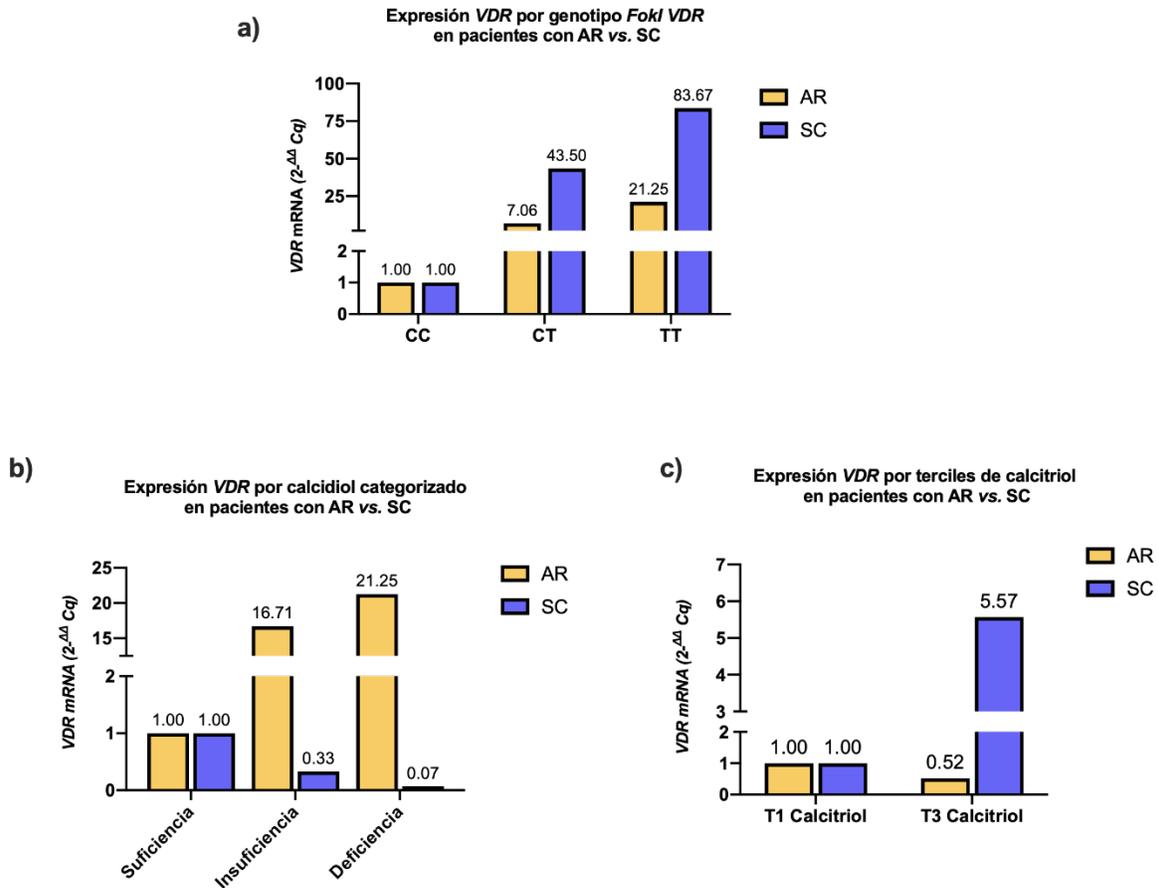
También se analizó el puntaje del índice de actividad clínica DAS28 en pacientes con AR de acuerdo con el genotipo del polimorfismo *FokI VDR*. No se observaron diferencias en el índice DAS28 entre los portadores de los genotipos CC, CT y TT en los pacientes con AR (Figura suplementaria 6).



**Figura suplementaria 6. Actividad clínica de la enfermedad (DAS 28) categorizada por genotipo del polimorfismo FokI VDR en pacientes con artritis reumatoide (AR).**

Datos presentados en mediana y rangos intercuartiles. Prueba *Kruskall*

Por último, se analizó la expresión de los genes de interés (VDR, ROR y FOXP3) por genotipo de *FokI*. Respecto a la expresión de *VDR* analizada por genotipo de *FokI* (genotipo homocigoto silvestre CC se tomó de referencia), observamos que los pacientes con AR expresan menos *VDR* que las SC portadoras de los genotipos heterocigoto CT y homocigoto TT (CT: AR= 7.06 vs. SC= 43.50; TT: AR= 21.25 vs. 83.67) (Figura suplementaria 7a).



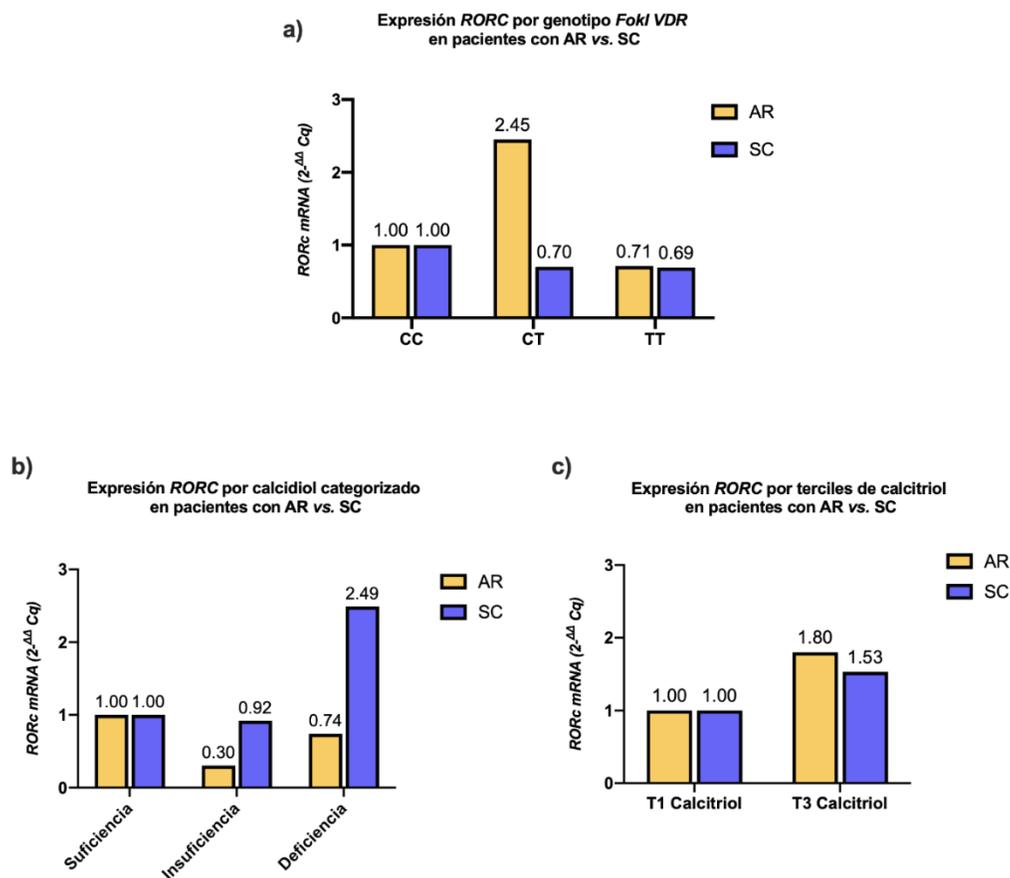
**Figura suplementaria 7. Análisis de expresión mRNA VDR en pacientes AR y SC.**

a) Expresión mRNA VDR en pacientes AR y SC por genotipo *FokI* (CC: genotipo de referencia); b) Expresión mRNA VDR en pacientes AR y SC por calcidiol categorizado (suficiencia: categoría de referencia); c) Expresión mRNA VDR en pacientes AR y SC por terciles de calcitriol (T1 calcitriol: categoría de referencia). AR= Artritis reumatoide. SC= Sujetos controles. Categoría de referencia = 1. Datos expresados en  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  normalizados con mRNA de *GAPDH* como gen de referencia.

Al analizar por categorías de calcidiol las pacientes AR con deficiencia (<20 ng/mL) expresan 21.25 veces más VDR comparadas con las pacientes AR con suficiencia ( $\geq 30$  ng/mL). Las que presentaron insuficiencia de calcidiol ( $\geq 20 - 30$  ng/mL) expresan 16.71 veces más VDR vs. AR con suficiencia de vitamina D. Las SC con deficiencia expresan 14.28 veces menos comparadas con las SC con suficiencia ( $2^{-\Delta\Delta Cq} = 0.07$ ), así mismo, las SC con insuficiencia expresan 3.33 veces menos comparadas con las SC con suficiencia de vitamina D ( $2^{-\Delta\Delta Cq} = 0.33$ ) (Figura

suplementaria 7b). En cuanto a los niveles de calcitriol, las pacientes con AR ubicadas en el tercil 3 (T3) de calcitriol expresan 1.92 veces menos vs. las AR ubicadas en el T1. Las SC ubicadas en el T3 de calcitriol expresan 5.57 veces más que aquellas SC ubicadas en el T1 de calcitriol (Figura suplementaria 7c).

Así mismo, se analizó la expresión del gen *RORC* en ambos grupos por genotipo del polimorfismo *FokI VDR*, por calcidiol categorizado y terciles de calcitriol (Figura suplementaria 8).



**Figura suplementaria 8. Análisis de la expresión mRNA *RORC* pacientes AR y SC.**

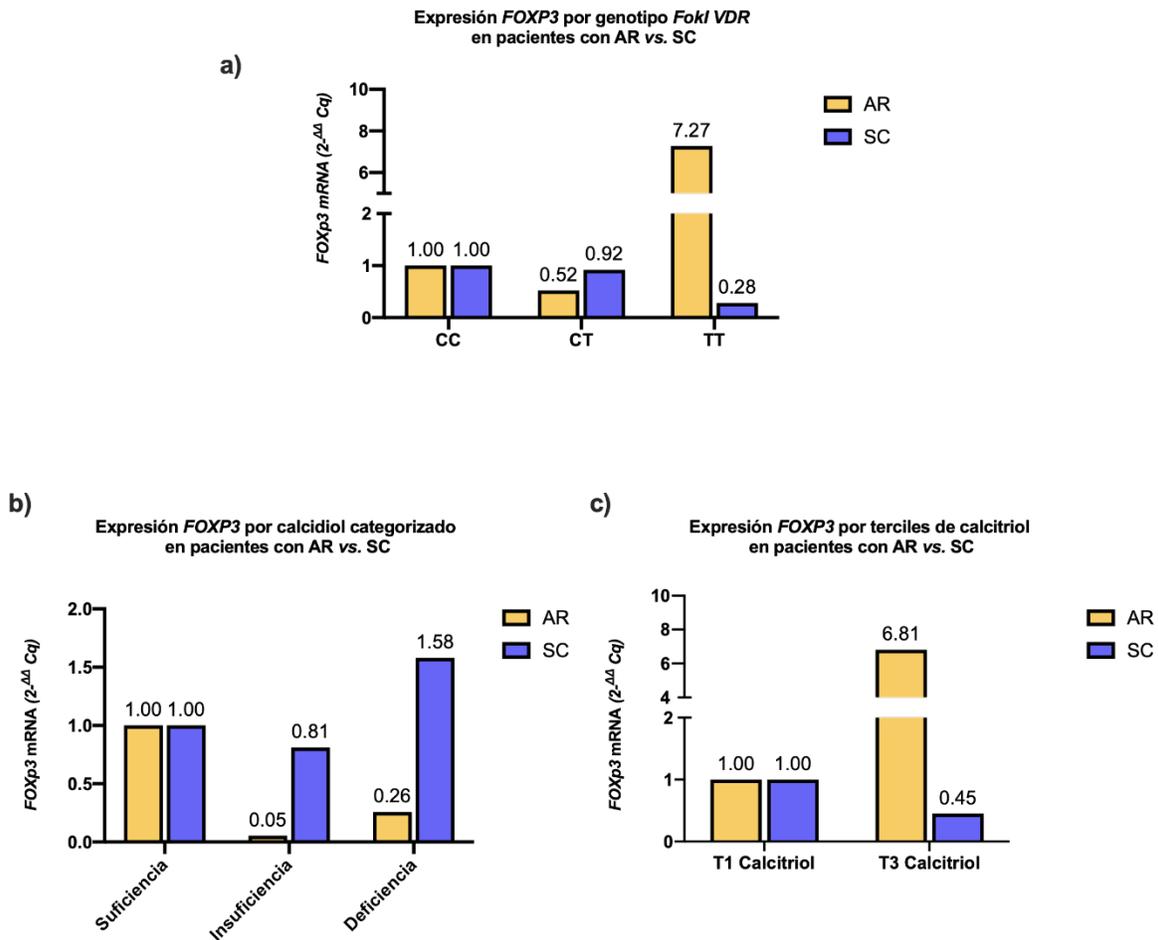
a) Expresión mRNA *RORC* en pacientes AR y SC por genotipo *FokI* (CC: genotipo de referencia); b) Expresión mRNA *VDR* en pacientes AR y SC por calcidiol categorizado (suficiencia: categoría de referencia); c) Expresión mRNA *VDR* en pacientes AR y SC por terciles de calcitriol (T1 calcitriol: categoría de referencia). AR= Artritis reumatoide. SC= Sujetos control. Categoría de referencia = 1. Datos expresados en 2<sup>- ΔΔ</sup> Cq normalizados con mRNA de *GAPDH* como gen de referencia.

La expresión de *RORc* fue 2.45 veces mayor en las pacientes con AR portadoras del genotipo heterocigoto CT vs. aquellas portadoras del genotipo homocigoto silvestre CC, así mismo, las AR portadoras del genotipo TT expresan 1.4 veces menos en comparación con las portadoras del genotipo del FF ( $2^{-\Delta\Delta Cq}=0.71$ ) (Figura suplementaria 8a).

En el caso del calcidiol categorizado las AR con deficiencia expresan 1.41 veces menos *RORC* vs. las AR con suficiencia ( $2^{-\Delta\Delta Cq}=0.74$ ). Las pacientes AR con deficiencia expresan 1.35. veces menos en comparación a las que tienen niveles suficientes de calcidiol ( $2^{-\Delta\Delta Cq}= 0.74$ ), de manera contraria las SC con deficiencia de calcidiol expresan 2.49 veces más *RORc* en comparación con las SC con suficiencia de vitamina D (Figura suplementaria 8b). En cuanto a los terciles de calcitriol, las pacientes AR ubicadas en el T3 expresan 1.8 veces más *RORc* que las AR ubicadas en el T1, así mismo, las SC ubicadas en el T3 expresan 1.5 veces más *RORc* que las ubicadas en T1 (Figura suplementaria 8c).

Para el caso del gen *FOXP3*, observamos que las AR portadoras del genotipo homocigoto ff expresan 7.27 veces más *FOXP3* que las AR portadoras del genotipo homocigoto silvestre CC y las portadoras del heterocigoto CT expresan 1.9 veces menos *FOXP3* que las AR CC ( $2^{-\Delta\Delta Cq}= 0.52$ ). En el caso de las SC, las portadoras del genotipo TT expresan 3.57 veces menos *FOXP3* ( $2^{-\Delta\Delta Cq}= 0.28$ ) y las SC portadoras del genotipo heterocigoto CT expresan 1.08 veces menos *FOXP3* comparadas con las AR portadoras del genotipo homocigoto CC ( $2^{-\Delta\Delta Cq}=0.92$ )(Figura suplementaria 9a).

Al hacer la comparativa con suficiencia de calcidiol las pacientes AR deficientes de vitamina D expresan 3.8 veces menos *FOXP3* ( $2^{-\Delta\Delta Cq}=0.26$ ) y aquellas con insuficiencia 20 veces menos *FOXP3* ( $2^{-\Delta\Delta Cq}=0.05$ ) al compararlas con las AR con suficiencia de calcidiol. De manera contraria las SC con deficiencia de calcidiol expresan 1.58 veces más *FOXP3* y aquellas con insuficiencia 1.23 veces menos *FOXP3* vs. las SC con suficiencia ( $2^{-\Delta\Delta Cq}=0.81$ ) (Figura suplementaria 9b).

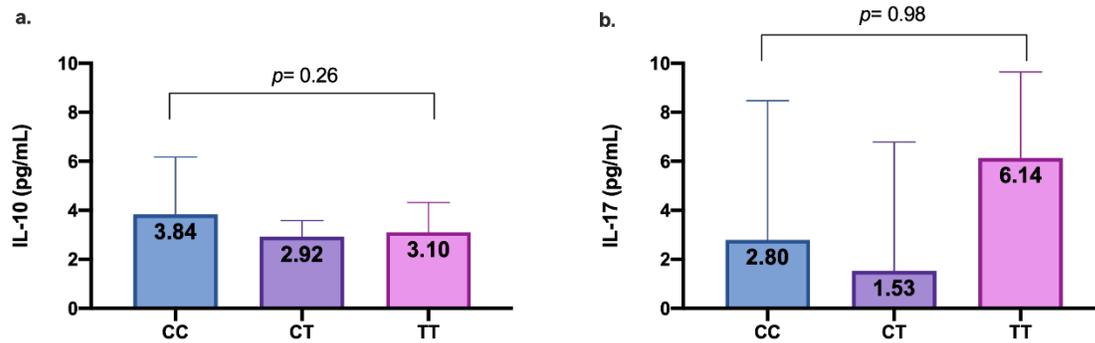


**Figura suplementaria 9. Análisis de la expresión mRNA *FOXP3* en pacientes AR y SC.**

a) Expresión mRNA *FOXP3* en pacientes AR y SC por genotipo *FokI* (CC: genotipo de referencia); b) Expresión mRNA *VDR* en pacientes AR y SC por calcitriol categorizado (suficiencia: categoría de referencia); c) Expresión mRNA *VDR* en pacientes AR y SC por terciles de calcitriol (T1 calcitriol: categoría de referencia). AR= Artritis reumatoide. SC= Sujetos controles. Categoría de referencia = 1. Datos expresados en 2<sup>-ΔΔCq</sup> normalizados con mRNA de *GAPDH* como gen de referencia.

Al hacer la comparativa por terciles de calcitriol, las AR ubicadas en el (T3) expresan 6.81 veces más *FOXP3* que aquellas ubicadas en el tercil uno (T1). Las SC ubicadas en el T3 expresan 2.22 veces menos *FOXP3* en comparación con las SC ubicadas en el T1 de calcitriol (2<sup>-ΔΔCq</sup>=0.45) (Figura suplementaria 9c).

Por último se analizaron las concentraciones de las citocinas IL-10 e IL-17 entre los distintos genotipos del polimorfismo *FokI*. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de las citocinas entre los genotipos de *FokI* (Figura suplementaria 10).

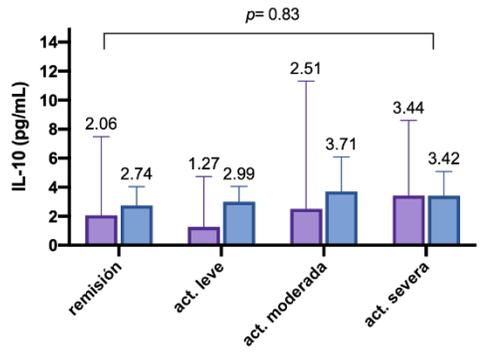


**Figura suplementaria 10. Niveles séricos de IL-10 e IL-17 estratificados por los genotipos del polimorfismo *FokI*.**

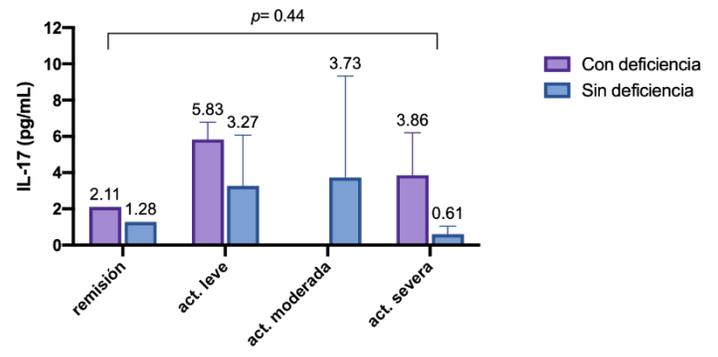
Datos presentados en mediana (p5-p95). Valor de p: prueba *Kruskall-Wallis*. Prueba post-hoc *Dunn's*.

También se analizaron las concentraciones de ambas citocinas (IL-10 e IL-17) estratificadas por actividad clínica (DAS28) en pacientes con AR categorizadas con deficiencia (<20 ng/mL) y sin deficiencia ( $\geq 20$  ng/mL) de vitamina D. No se encontraron diferencias en los niveles séricos de citocinas IL-10 e IL-17 entre las distintas categorías del índice DAS28 en las pacientes con deficiencia y sin deficiencia de calcidiol (Figura suplementaria 11).

a. IL-10 estratificada por actividad clínica (DAS 28) en pacientes con deficiencia y sin deficiencia de vitamina D



b. IL-17 estratificada por actividad clínica (DAS 28) en pacientes con deficiencia y sin deficiencia de vitamina D



**Figura suplementaria 11. Niveles séricos de IL-10 e IL-17 estratificadas por actividad clínica (DAS 28) en pacientes con y sin deficiencia de calcidiol.**

Datos presentados en mediana (p5-p95). Valor de p: prueba *Kruskall-Wallis*. Prueba post-hoc *Dunn's*.

**Cuadro suplementario 5. Correlaciones de los metabolitos de la vitamina D con variables antropométricas, bioquímicas y clínicas en pacientes con AR.**

Variable	sVDR (pg/mL)				Ratio calcitriol/calcidiol (pg/ng)				Calcitriol (pg/mL)			
	AR (n=99)		SC (n=110)		AR (n=99)		SC (n=110)		AR (n=99)		SC (n=110)	
	r	Valor de p *	r	Valor de p *	r	Valor de p *	r	Valor de p *	r	Valor de p *	r	Valor de p *
Edad (años)	0.07	0.47	<b>-0.29</b>	<b>&lt;0.01</b>	-0.07	0.42	0.03	0.73	-0.06	0.42	-0.07	0.35
Peso (Kg)	-0.08	0.39	<b>-0.25</b>	<b>&lt;0.01</b>	0.001	0.96	0.09	0.2	-0.03	0.72	-0.01	0.86
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	-0.06	0.50	<b>-0.25</b>	<b>&lt;0.01</b>	-0.02	0.75	0.12	0.11	-0.04	0.60	-0.01	0.88
Circunferencia de cintura (cm)	0.12	0.23	<b>-0.30</b>	<b>&lt;0.01</b>	0.06	0.53	0.09	0.22	0.11	0.19	-0.05	0.51
Circunferencia de cadera (cm)	-0.08	0.44	<b>-0.27</b>	<b>&lt;0.01</b>	0.04	0.63	0.05	0.48	0.10	0.23	-0.05	0.49
ICC	<b>0.26</b>	<b>0.01</b>	<b>-0.21</b>	<b>0.02</b>	0.09	0.33	0.09	0.18	0.12	0.15	-0.01	0.88
Glucosa (mg/dL)	0.17	0.09	-0.16	0.07	0.09	0.28	0.12	0.09	0.07	0.37	0.05	0.54
Colesterol, Total (mg/dL)	<b>0.24</b>	<b>0.01</b>	-0.14	0.12	0.19	0.83	-0.01	0.86	0.05	0.49	-0.04	0.57
Triglicéridos (mg/dL)	<b>0.21</b>	<b>0.03</b>	<b>-0.24</b>	<b>&lt;0.01</b>	0.02	0.81	0.08	0.25	0.1	0.19	-0.004	0.95
HDL-C (mg/dL)	-0.03	0.70	0.14	0.13	-0.04	0.61	-0.03	0.64	0.08	0.34	0.08	0.22
LDL-C (mg/dL)	<b>0.26</b>	<b>&lt;0.01</b>	-0.09	0.33	0.11	0.22	-0.07	0.36	0.15	0.07	-0.07	0.32
pCr (mg/L)	0.20	0.05	-0.13	0.16	<b>0.23</b>	<b>0.01</b>	0.10	0.17	<b>0.28</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.07	0.35
Índice de Kannel	<b>0.25</b>	<b>0.01</b>	-0.14	0.13	0.13	0.15	-0.07	0.37	<b>0.22</b>	<b>0.007</b>	-0.13	0.06
Índice Tg/HDL-C	0.18	0.06	<b>-0.22</b>	<b>0.02</b>	0.05	0.54	0.07	0.35	<b>0.17</b>	<b>0.04</b>	-0.04	0.59
Índice de Castelli	<b>0.21</b>	<b>0.03</b>	-0.18	0.05	0.06	0.47	-0.002	0.97	<b>0.16</b>	<b>0.04</b>	-0.13	0.08
Calcidiol (ng/mL)	-0.13	0.19	0.12	0.21	-	-	-	-	<b>-0.3</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.08	0.27
Calcitriol (pg/dL)	<b>0.21</b>	<b>0.03</b>	0.10	0.26	-	-	-	-	-	-	-	-
Calcitriol/calcidiol ratio (pg/ml/ng/mL)	0.19	0.05	0.01	0.85	-	-	-	-	-	-	-	-
Albúmina (g/dL)	0.03	0.73	<b>0.30</b>	<b>&lt;0.01</b>	-0.09	0.31	0.02	0.81	0.08	0.30	0.04	0.56

Análisis de correlación sVDR (pg/mL) y metabolitos de la vitamina D (ratio calcitriol/calcidiol y calcitriol) con variables antropométricas, bioquímicas, clínicas y con los metabolitos de la vitamina D en pacientes con AR. AR: artritis reumatoide; SC: sujetos control; sVDR: receptor de vitamina D. Los números en negritas indican diferencia significativa. Valor de  $p < 0.05$  por test de *Spearman*.

## XV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilar-Velázquez, J.A. *et al.* (2016) 'Population data of 23 STR loci (PowerPlex® Fusion System) in Mexican Mestizos from the West Region', *International Journal of Legal Medicine*, 130(6), pp. 1489–1491. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1361-0>.
2. Aktürk, T. *et al.* (2019) 'Vitamin D, vitamin D binding protein, vitamin D receptor levels and cardiac dysautonomia in patients with multiple sclerosis: a cross-sectional study', *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 77(12), pp. 848–854. Available at: <https://doi.org/10.1590/0004-282X20190182>.
3. Aletaha, D. *et al.* (2010a) '2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69(9), pp. 1580–1588. Available at: <https://doi.org/10.1136/ard.2010.138461>.
4. Aletaha, D. *et al.* (2010b) '2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 69(9), pp. 1580–1588. Available at: <https://doi.org/10.1136/ard.2010.138461>.
5. Al-Ghafari, A.B., Balamash, K.S. and Al Doghaither, H.A. (2020) 'Serum vitamin D receptor (VDR) levels as a potential diagnostic marker for colorectal cancer', *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(3), pp. 827–832. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.01.006>.
6. Al-Saadany, H.M. *et al.* (2016) 'Th-17 cells and serum IL-17 in rheumatoid arthritis patients: Correlation with disease activity and severity', *The Egyptian Rheumatologist*, 38(1), pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejr.2015.01.001>.
7. Altun, H. *et al.* (2018) 'The levels of Vitamin D, Vitamin D receptor, homocysteine and complex B Vitamin in children with autism spectrum disorders', *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 16(4), pp. 383–390. Available at: <https://doi.org/10.9758/cpn.2018.16.1.383>.
8. Alvarez-Nemegyei, J. *et al.* (2018) 'Association between Overweight/Obesity and Clinical Activity in Rheumatoid Arthritis', *Reumatologia Clinica*, (xx), pp. 6–11. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2018.11.005>.
9. Al-Zifzaf, D.S. *et al.* (2015) 'FoxP3+T regulatory cells in Rheumatoid arthritis and the imbalance of the Treg/TH17 cytokine axis', *The Egyptian Rheumatologist*, 37(1), pp. 7–15. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejr.2014.06.004>.
10. Andreoli, L. *et al.* (2015) 'A 24-month prospective study on the efficacy and safety of two different monthly regimens of Vitamin D supplementation in premenopausal women with systemic lupus erythematosus', *Lupus*, 24(4–5), pp.

- 499–506. Available at: <https://doi.org/10.1177/0961203314559089>.
11. Anisiewicz, A. *et al.* (2020) 'Calcitriol in the Presence of Conditioned Media from Metastatic Breast Cancer Cells Enhances Ex Vivo Polarization of M2 Alternative Murine Bone Marrow-Derived Macrophages', *Cancers*, 12(11), p. 3485. Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers12113485>.
  12. Ateş, Ö. (2011) 'Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Rheumatoid Arthritis', *Turkish Journal of Rheumatology*, 26(2), pp. 145–149. Available at: <https://doi.org/10.5152/tjr.2011.021>.
  13. Atwa, S. *et al.* (2019) 'Serum Interleukin-17 Level in Patients with Rheumatoid Arthritis and its Relation to Disease Activity', *Zagazig University Medical Journal*, 0(0), pp. 0–0. Available at: <https://doi.org/10.21608/zumj.2019.11577.1196>.
  14. Avina-Zubieta, J.A. *et al.* (2012) 'Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 71(9), pp. 1524–1529. Available at: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200726>.
  15. Azzeh, F.S. and Kensara, O.A. (2015) 'Vitamin D Is a Good Marker for Disease Activity of Rheumatoid Arthritis Disease', *Disease Markers*, 2015, pp. 1–6. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/260725>.
  16. Bae, S.C. and Lee, Y.H. (2018) 'Vitamin D receptor FokI, TaqI, and Apal polymorphisms and susceptibility to systemic lupus erythematosus: an updated meta-analysis', *Clinical Rheumatology*, 37(6), pp. 1529–1537. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10067-018-4036-z>.
  17. Barnes, P.F. *et al.* (1989) 'Transpleural gradient of 1,25-dihydroxyvitamin D in tuberculous pleuritis.', *Journal of Clinical Investigation*, 83(5), pp. 1527–1532. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI114048>.
  18. Beere, H.M. and Green, D.R. (2017) *Immunologic Repercussions of Cell Death*. Tenth Edit, *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology*. Tenth Edit. Elsevier Inc. Available at: <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-31696-5.00028-0>.
  19. Benito-Garcia, E. *et al.* (2007) 'Open Access Protein, iron, and meat consumption and risk for rheumatoid arthritis: a prospective cohort study'. Available at: <https://doi.org/10.1186/ar2123>.
  20. Berube, L.T. *et al.* (2017) 'Diet quality of individuals with rheumatoid arthritis using the healthy eating index (HEI)-2010', *Nutrition and Health*, 23(1), pp. 17–24. Available at: <https://doi.org/10.1177/0260106016688223>.
  21. Bikle, Daniel D. (2014) 'Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications', *Chemistry and Biology*, 21(3), pp. 319–329. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.016>.
  22. Bikle, Daniel D. (2014) 'Vitamin D Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Applications', *Chemistry & Biology*, 21(3), pp. 319–329. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.016>.
  23. Bizzaro, G. *et al.* (2017a) 'Vitamin D and autoimmune diseases: Is vitamin D

- receptor (VDR) polymorphism the culprit?', *Israel Medical Association Journal*, 19(7), pp. 438–443.
24. Bizzaro, G. *et al.* (2017b) 'Vitamin D and autoimmune diseases: Is vitamin D receptor (VDR) polymorphism the culprit?', *Israel Medical Association Journal*, pp. 438–443.
  25. Bizzaro, G. *et al.* (2017c) 'Vitamin D and Autoimmune Diseases: Is Vitamin D Receptor (VDR) Polymorphism the Culprit?', 19, p. 6.
  26. Bodoki, L. *et al.* (2015) 'Vitamin D receptor gene polymorphisms and haplotypes in hungarian patients with idiopathic inflammatory myopathy', *BioMed Research International*, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/809895>.
  27. Bossard, M. *et al.* (2015) 'Plasma endothelin-1 and cardiovascular risk among young and healthy adults', *Atherosclerosis*, 239(1), pp. 186–191. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.061>.
  28. Bustamante, M.F. *et al.* (2020) 'Design of an anti-inflammatory diet (ITIS diet) for patients with rheumatoid arthritis', *Contemporary Clinical Trials Communications*, 17(September 2019), p. 100524. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.conctc.2020.100524>.
  29. Calder, P.C. (2012) 'Fatty acids: Long-chain fatty acids and inflammation', *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(2), pp. 284–289. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0029665112000067>.
  30. Celikbilek, A. *et al.* (2014) 'Serum levels of vitamin D, vitamin D-binding protein and vitamin D receptor in migraine patients from central Anatolia region', *International Journal of Clinical Practice*, 68(10), pp. 1272–1277. Available at: <https://doi.org/10.1111/ijcp.12456>.
  31. Charoenngam, N., Shirvani, A. and Holick, M.F. (2019) 'Vitamin D for skeletal and non-skeletal health: What we should know', *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 10(6), pp. 1082–1093. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2019.07.004>.
  32. Chen, J. *et al.* (2016) 'An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis', *Genome Medicine*, 8(1), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0299-7>.
  33. Christakos, S. *et al.* (2016) 'Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects', *Physiol Rev*, 96, pp. 365–408. Available at: <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015.-1,25-Dihydrox>.
  34. Chung, C.P. *et al.* (2013) 'Progression of coronary artery atherosclerosis in rheumatoid arthritis: comparison with participants from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis', *Arthritis Research & Therapy*, 15(5), p. R134. Available at: <https://doi.org/10.1186/ar4314>.
  35. Cush, J.J. *et al.* (1995) 'Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis: ELEVATED IL-10 RA PATIENTS', *Arthritis & Rheumatism*, 38(1), pp. 96–104. Available at: <https://doi.org/10.1002/art.1780380115>.

36. Dankers, W. *et al.* (2017a) 'Vitamin D in autoimmunity: Molecular mechanisms and therapeutic potential', *Frontiers in Immunology*, 7(JAN). Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00697>.
37. Dankers, W. *et al.* (2017b) 'Vitamin D in Autoimmunity: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential', *Frontiers in Immunology*, 7. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00697>.
38. Dobnig, H. (2008) 'Independent Association of Low Serum 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D Levels With All-Cause and Cardiovascular Mortality', *Archives of Internal Medicine*, 168(12), p. 1340. Available at: <https://doi.org/10.1001/archinte.168.12.1340>.
39. E, T.P. *et al.* (2014) 'How to use vitamin D , and what supplementary dose would be the optimum to achieve the best balance between efficacy and security ?', 25(Supl 1), pp. 4–7.
40. England, B.R. *et al.* (2018) 'Increased cardiovascular risk in rheumatoid arthritis: mechanisms and implications', *BMJ*, p. k1036. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmj.k1036>.
41. Enith, K., Blanco, J. and Maya, G.C. (2011) 'Vitamina D: nuevos paradigmas', *Medicina & Laboratorio*, 17(5–6), pp. 211–246.
42. Farag, M.A. *et al.* (2020) 'Serum and synovial fluid interleukin-17 concentrations in rheumatoid arthritis patients: Relation to disease activity, radiographic severity and power Doppler ultrasound', *The Egyptian Rheumatologist*, 42(3), pp. 171–175. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejr.2020.02.009>.
43. Furusawa, Y. *et al.* (2013) 'Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells', *Nature*, 504(7480), pp. 446–450. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature12721>.
44. G, C. *et al.* (2016) 'Article : Predicting adult obesity from childhood obesity : a systematic review and meta-analysis', pp. 95–107. Available at: <https://doi.org/10.1111/obr.12334>.
45. Giuseppe, D. Di *et al.* (2014) *Fish consumption and risk of rheumatoid arthritis: a dose-response meta-analysis*. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13075-014-0446-8>.
46. Di Giuseppe, D. *et al.* (2014) 'Long-term intake of dietary long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and risk of rheumatoid arthritis: A prospective cohort study of women', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(11), pp. 1949–1953. Available at: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203338>.
47. Gómez, A. (2011) 'Nuevos criterios de clasificación de artritis reumatoide', *Reumatología Clínica*, 6(SUPPL. 3), pp. 33–37. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2011.01.002>.
48. González-Mercado, A. *et al.* (2013) 'Association analysis of vitamin D receptor gene polymorphisms and bone mineral density in postmenopausal Mexican-Mestizo women', *Genetics and Molecular Research*, 12(3), pp. 2755–2763.

Available at: <https://doi.org/10.4238/2013.July.30.13>.

49. Van Hamburg, J.P. *et al.* (2011) 'Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production', *Arthritis and Rheumatism*, 63(1), pp. 73–83. Available at: <https://doi.org/10.1002/art.30093>.
50. He, X.J. *et al.* (2016) 'Roles of 1,25(OH) 2 D 3 and Vitamin D Receptor in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus by Regulating the Activation of CD4 + T Cells and the PKC $\delta$ /ERK Signaling Pathway', *Cellular Physiology and Biochemistry*, 40(3–4), pp. 743–756. Available at: <https://doi.org/10.1159/000453135>.
51. Hernández-Bello, J. *et al.* (2017) 'Aberrant expression of interleukin-10 in rheumatoid arthritis: Relationship with IL10 haplotypes and autoantibodies', *Cytokine*, 95, pp. 88–96. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.02.022>.
52. Hu, Y., Costenbader, Karen H., *et al.* (2014) 'Sugar-sweetened soda consumption and risk of developing rheumatoid arthritis in women', *American Journal of Clinical Nutrition*, 100(3), pp. 959–967. Available at: <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.086918>.
53. Hu, Y., Costenbader, Karen H, *et al.* (2014) 'Sugar-sweetened soda consumption and risk of developing rheumatoid arthritis in women', *American Journal of Clinical Nutrition*, 100(3), pp. 959–967. Available at: <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.086918>.
54. Hu, Y. *et al.* (2017) 'Long-term Dietary Quality and Risk of Developing Rheumatoid Arthritis in Women HHS Public Access', *Ann Rheum Dis*, 76(8), pp. 1357–1364. Available at: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210431>.
55. Huhtakangas, J.A. *et al.* (2004) 'The Vitamin D Receptor Is Present in Caveolae-Enriched Plasma Membranes and Binds 1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ -Vitamin D $_3$  in Vivo and in Vitro', *Molecular Endocrinology*, 18(11), pp. 2660–2671. Available at: <https://doi.org/10.1210/me.2004-0116>.
56. Illescas-Montes, R. *et al.* (2019) 'Vitamin D and autoimmune diseases', *Life Sciences*, 233, p. 116744. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116744>.
57. Iniesta, R., Guinó, E. and Moreno, V. (2005) 'Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos', *Gaceta Sanitaria*, 19(4), pp. 333–341. Available at: <https://doi.org/10.1157/13078029>.
58. Ito, T. *et al.* (2008) 'Two Functional Subsets of FOXP3+ Regulatory T Cells in Human Thymus and Periphery', *Immunity*, 28(6), pp. 870–880. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.018>.
59. Izaola, O. *et al.* (2015) 'Inflamación y obesidad ( lipoinflamación )', 31(6), pp. 2352–2358. Available at: <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.6.8829>.
60. Jaillier, J.C.R., Arango, A.M.P. and Pérez, D.A.M. (2015) 'Challenges faced in Latin America for the implementation of an ideal health-care model for rheumatoid

- arthritis patients: are we ready?', *Clinical Rheumatology*, 34(S1), pp. 79–93. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10067-015-3034-7>.
61. Jeffery, L.E. *et al.* (2012) 'Availability of 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> to APCs Controls the Balance between Regulatory and Inflammatory T Cell Responses', *The Journal of Immunology*, 189(11), pp. 5155–5164. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200786>.
  62. Jehan, F., d'Alésio, A. and Garabédian, M. (2007) 'Exons and functional regions of the human vitamin D receptor gene around and within the main 1a promoter are well conserved among mammals', *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 103(3–5), pp. 361–367. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.12.057>.
  63. John, P. *et al.* (2017) 'Case-control study of vitamin D receptor gene polymorphism in Pakistani rheumatoid arthritis patients', *Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)*, 57(6), pp. 633–636. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.rbre.2015.07.003>.
  64. Joshi, S. *et al.* (2011) '25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> Ameliorates Th17 Autoimmunity via Transcriptional Modulation of Interleukin-17A', *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 31(17), pp. 3653–3669. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.05020-11>.
  65. Jung, S.M. *et al.* (2014) 'AB0145 Sodium Chloride Aggravates Arthritis by TH17 Polarization', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(Suppl 2), p. 851.2-851. Available at: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-eular.5138>.
  66. Jurutka, P.W. *et al.* (2000) 'Department of Biochemistry College of Medicine University of Arizona Tucson, Arizona 85724', 14(3), p. 20.
  67. Källberg, H. *et al.* (2011) 'Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: Estimations of risks after various exposures to cigarette smoke', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 70(3), pp. 508–511. Available at: <https://doi.org/10.1136/ard.2009.120899>.
  68. Karray, E.F. *et al.* (2012a) 'Associations of vitamin D receptor gene polymorphisms FokI and BsmI with susceptibility to rheumatoid arthritis and Behçet's disease in Tunisians', *Joint Bone Spine*, 79(2), pp. 144–148. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2011.06.003>.
  69. Karray, E.F. *et al.* (2012b) 'Associations of vitamin D receptor gene polymorphisms FokI and BsmI with susceptibility to rheumatoid arthritis and Behçet's disease in Tunisians', *Joint Bone Spine*, 79(2), pp. 144–148. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2011.06.003>.
  70. Kaviani, nafiseh *et al.* (2019) 'The Association of Vitamin D Receptor Polymorphisms of FokI and TaqI with Rheumatoid Arthritis in North-East of Iran', *Jorjani Biomedicine Journal*, 7(4), pp. 20–29. Available at: <https://doi.org/10.29252/jorjanibiomedj.7.4.20>.
  71. Kerekes, G. *et al.* (2014) 'Rheumatoid arthritis and metabolic syndrome', *Nature*

- Reviews Rheumatology*, 10(11), pp. 691–696. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.121>.
72. Kerr Whitfield, G. *et al.* (2001) 'Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 177(1–2), pp. 145–159. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00406-3](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00406-3).
73. Kerr Whitfield, G *et al.* (2001) 'Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 177(1–2), pp. 145–159. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00406-3](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00406-3).
74. Kim, S., Shevde, N.K. and Pike, J.W. (2004) '1,25-Dihydroxyvitamin D3 Stimulates Cyclic Vitamin D Receptor/Retinoid X Receptor DNA-Binding, Co-activator Recruitment, and Histone Acetylation in Intact Osteoblasts', *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(2), pp. 305–317. Available at: <https://doi.org/10.1359/JBMR.041112>.
75. Klaus, G. *et al.* (1997) 'Parathyroid hormone prevents 1,25(OH)2D3 induced down-regulation of the vitamin D receptor in growth plate chondrocytes in vitro', *Kidney International*, 52(1), pp. 45–51. Available at: <https://doi.org/10.1038/ki.1997.302>.
76. Kongsbak, M. *et al.* (2013) 'The Vitamin D Receptor and T Cell Function', *Frontiers in Immunology*, 4. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00148>.
77. Konig, M.F. *et al.* (2016) 'Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis', *Science Translational Medicine*, 8(369), pp. 1–13. Available at: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaj1921>.
78. Kültür, T. *et al.* (2019) 'The relationship of serum vitamin D receptor levels with disease activity and clinical parameters in patients with ankylosing spondylitis', *Turkish Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 65(4), pp. 389–393. Available at: <https://doi.org/10.5606/TFTRD.2019.3296>.
79. Lawson, C.A. *et al.* (2006) 'Early rheumatoid arthritis is associated with a deficit in the CD4+CD25high regulatory T cell population in peripheral blood', *Rheumatology*, 45(10), pp. 1210–1217. Available at: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kei089>.
80. Lee, Y.H. *et al.* (2011) 'Associations between vitamin D receptor polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a meta-analysis', *Molecular Biology Reports*, 38(6), pp. 3643–3651. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0477-4>.
81. Li, L. *et al.* (2013) 'Vitamin D receptor gene polymorphisms and type 2 diabetes: A Meta-analysis', *Archives of Medical Research*, 44(3), pp. 235–241. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2013.02.002>.
82. Lubberts, E. (2015) 'The IL-23–IL-17 axis in inflammatory arthritis', *Nature Reviews Rheumatology*, 11(7), pp. 415–429. Available at:

- <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.53>.
83. Lucca, L.E. and Dominguez-Villar, M. (2020) 'Modulation of regulatory T cell function and stability by co-inhibitory receptors', *Nature Reviews Immunology*, 20(11), pp. 680–693. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0296-3>.
  84. Mahto, H. *et al.* (2018) 'Association between vitamin D receptor polymorphisms and systemic lupus erythematosus in an Indian cohort', *International Journal of Rheumatic Diseases*, 21(2), pp. 468–476. Available at: <https://doi.org/10.1111/1756-185X.13245>.
  85. Majumdar, S. and Aggarwal, B.B. (2001) 'Methotrexate Suppresses NF- $\kappa$ B Activation Through Inhibition of I $\kappa$ B $\alpha$  Phosphorylation and Degradation', *The Journal of Immunology*, 167(5), pp. 2911–2920. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.5.2911>.
  86. Mancuso, P. (2016) 'The role of adipokines in chronic inflammation', *ImmunoTargets and Therapy*, 5, pp. 47–56. Available at: <https://doi.org/10.2147/ITT.S73223>.
  87. Masuko, K. (2014) 'Rheumatoid Cachexia Revisited: A Metabolic Co-Morbidity in Rheumatoid Arthritis', *Frontiers in Nutrition*, 1(November), pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnut.2014.00020>.
  88. Masuko, K. (2018) 'A potential benefit of “balanced diet” for rheumatoid arthritis', *Frontiers in Medicine*, 5(MAY), pp. 1–5. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00141>.
  89. McInnes, I.B. and Schett, G. (2011) 'Mechanism of Disease The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis', *New England Journal of Medicine*, 365(23), pp. 2205–2219.
  90. Merlino, L.A. *et al.* (2004) 'Vitamin D Intake Is Inversely Associated With Rheumatoid Arthritis: Results From the Iowa Women's Health Study', *Arthritis and Rheumatism*, 50(1), pp. 72–77. Available at: <https://doi.org/10.1002/art.11434>.
  91. Meza-Meza, M.R. *et al.* (2019) 'Relationship of excess weight with clinical activity and dietary intake deficiencies in systemic lupus erythematosus patients', *Nutrients*, 11(11). Available at: <https://doi.org/10.3390/nu11112683>.
  92. Meza-Meza, M.R. *et al.* (2021) 'Association of High Calcitriol Serum Levels and Its Hydroxylation Efficiency Ratio with Disease Risk in SLE Patients with Vitamin D Deficiency', *Journal of Immunology Research*. Edited by V. Padureanu, 2021, pp. 1–16. Available at: <https://doi.org/10.1155/2021/2808613>.
  93. Meza-Meza, M.R. *et al.* (2022) 'Vitamin D Receptor (VDR) Genetic Variants: Relationship of FokI Genotypes with VDR Expression and Clinical Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus Patients', *Genes*, 13(11), p. 2016. Available at: <https://doi.org/10.3390/genes13112016>.
  94. Miranda-Carús, M.-E. *et al.* (2004) 'IL-15 and the Initiation of Cell Contact-Dependent Synovial Fibroblast-T Lymphocyte Cross-Talk in Rheumatoid Arthritis: Effect of Methotrexate', *The Journal of Immunology*, 173(2), pp. 1463–1476. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.1463>.

95. Mizukami, Y. *et al.* (2017) 'Distinct patterns of dietary intake in different functional classes of patients with rheumatoid arthritis', *Topics in Clinical Nutrition*, 32(2), pp. 141–151. Available at: <https://doi.org/10.1097/TIN.000000000000099>.
96. Moghaddami, M. *et al.* (2015) 'Synovial fluid and plasma n3 long chain polyunsaturated fatty acids in patients with inflammatory arthritis', *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 97, pp. 7–12. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2015.02.005>.
97. Moreno-Montoya, J. *et al.* (2015) 'Association of regional and cultural factors with the prevalence of rheumatoid arthritis in the mexican population', *Journal of Clinical Rheumatology*, 21(2), pp. 57–62. Available at: <https://doi.org/10.1097/RHU.0000000000000223>.
98. Mosaad, Y.M. *et al.* (2014) 'Vitamin D receptor gene polymorphism as possible risk factor in rheumatoid arthritis and rheumatoid related osteoporosis', *Human Immunology*, 75(5), pp. 452–461. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2014.02.009>.
99. Mukhtar, M. *et al.* (2019) 'Vitamin D Receptor Gene Polymorphism: An Important Predictor of Arthritis Development', *BioMed Research International*, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/8326246>.
100. Murakami, I. *et al.* (2020) 'Intake frequency of vegetables or seafoods negatively correlates with disease activity of rheumatoid arthritis', *PLoS ONE*, 15(2), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228852>.
101. O'Shea, J.J. and Paul, W.E. (2010) 'Mechanisms Underlying Lineage Commitment and Plasticity of Helper CD4 + T Cells', *Science*, 327(5969), pp. 1098–1102. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1178334>.
102. Pasquali, M. *et al.* (2015) 'Calcitriol/calcifediol ratio: An indicator of vitamin D hydroxylation efficiency?', *BBA Clinical*, 3, pp. 251–256. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2015.03.004>.
103. Peláez-Ballestas, I. *et al.* (2011) 'Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology', *Journal of Rheumatology*, 38(SUPPL. 86), pp. 3–6. Available at: <https://doi.org/10.3899/jrheum.100951>.
104. Pierrot-Deseilligny, C. and Souberbielle, J.C. (2017) 'Vitamin D and multiple sclerosisAn update', *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 14(March), pp. 35–45. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.msard.2017.03.014>.
105. Pillai, S. *et al.* (1995) '1,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates the phosphatidylinositol signaling pathway in human keratinocytes by increasing phospholipase C levels.', *Journal of Clinical Investigation*, 96(1), pp. 602–609. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI118075>.
106. Qu,C.-H., Q. -F. Zou. (2019) 'Diagnostic values of serum IL-10 and IL-17 in rheumatoid arthritis and their correlation with serum 14-3-3 $\eta$  protein', 23, pp. 1899–1906.

107. Rambod, M., Nazarinia, M. and Raieskarimian, F. (2018) 'The impact of dietary habits on the pathogenesis of rheumatoid arthritis: a case-control study', *Clinical Rheumatology*, 37(10), pp. 2643–2648. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10067-018-4151-x>.
108. Rivera-Leon, E.A. *et al.* (2015) 'Vitamin-D receptor gene polymorphisms (TaqI and ApaI) and circulating osteocalcin in patients with type 2 diabetes and healthy subjects', *Endokrynologia Polska*, 66(4), pp. 329–333. Available at: <https://doi.org/10.5603/EP.2015.0042>.
109. Rodríguez-Carrio, J. *et al.* (2019) 'Vitamin D Receptor Polymorphism and DHCR7 Contribute to the Abnormal Interplay Between Vitamin D and Lipid Profile in Rheumatoid Arthritis', *Scientific Reports*, 9(1), pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38756-8>.
110. Saghir Afifeh, A.M. *et al.* (2021) 'Determinants of vitamin D activation in patients with acute coronary syndromes and its correlation with inflammatory markers', *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 31(1), pp. 36–43. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2020.09.021>.
111. Saleh, Alaa A., Al-Ali Shereen. (2022) 'The correlation between vitamin D3 and IL-17 in rheumatoid arthritis patients'.
112. Sassi, F., Tamone, C. and D'amelio, P. (2018) 'Vitamin D: Nutrient, hormone, and immunomodulator', *Nutrients*, 10(11), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.3390/nu10111656>.
113. Saxena, A. *et al.* (2015) 'Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy', *Cytokine*, 74(1), pp. 27–34. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.10.031>.
114. Schinocca, C. *et al.* (2021) 'Role of the IL-23/IL-17 Pathway in Rheumatic Diseases: An Overview', *Frontiers in Immunology*, 12, p. 637829. Available at: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.637829>.
115. Scrivo, R. *et al.* (2017) 'The role of dietary sodium intake on the modulation of T helper 17 cells and regulatory T cells in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus', *PLoS ONE*, 12(9), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184449>.
116. Shahrara, S. *et al.* (2009) 'IL-17 Induces Monocyte Migration in Rheumatoid Arthritis', *The Journal of Immunology*, 182(6), pp. 3884–3891. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802246>.
117. Shoenfeld, Y. *et al.* (2018) 'Vitamin D and systemic lupus erythematosus - The hype and the hope', *Autoimmunity Reviews*, 17(1), pp. 19–23. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.11.004>.
118. Silman, A.J. and Pearson, J.E. (2002) 'Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis', *Arthritis research*, 4, pp. S265–S272. Available at: <https://doi.org/10.1186/ar578>.
119. Slatkin, M. (2008) 'Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary

- past and mapping the medical future', *Nature Reviews Genetics*, 9(6), pp. 477–485. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrg2361>.
120. Smolen, J.S., Aletaha, Daniel., *et al.* (2018) 'Rheumatoid arthritis', *Nature Reviews Disease Primers*, 4, pp. 1–23.
  121. Smolen, J.S., Aletaha, D., *et al.* (2018) 'Rheumatoid arthritis', *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), p. 18001. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1>.
  122. Sparks, J.A. *et al.* (2019) 'Inflammatory dietary pattern and risk of developing rheumatoid arthritis in women', *Clinical Rheumatology*, 38(1), pp. 243–250. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10067-018-4261-5>.
  123. Spel, L. and Martinon, F. (2020) 'Inflammasomes contributing to inflammation in arthritis', *Immunological Reviews*, 294(1), pp. 48–62. Available at: <https://doi.org/10.1111/imr.12839>.
  124. Stolt, P. *et al.* (2005) 'Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: Results from the Swedish EIRA study', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(4), pp. 582–586. Available at: <https://doi.org/10.1136/ard.2004.022053>.
  125. Suen, J.-L. and Chiang, B.-L. (2012) 'CD4+FoxP3+ regulatory T-cells in human systemic lupus erythematosus', *Journal of the Formosan Medical Association*, 111(9), pp. 465–470. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2012.05.013>.
  126. Thakkinstian, A., D'Este, C. and Attia, J. (2004) 'Haplotype analysis of VDR gene polymorphisms: a meta-analysis', *Osteoporosis International*, 15(9), pp. 729–734. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00198-004-1601-x>.
  127. Tizaoui, K. *et al.* (2014) 'Vitamin D receptor TaqI and Apal polymorphisms: A comparative study in patients with Behçet's disease and Rheumatoid arthritis in Tunisian population', *Cellular Immunology*, 290(1), pp. 66–71. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.05.002>.
  128. Tizaoui, K. and Hamzaoui, K. (2015) 'Association between VDR polymorphisms and rheumatoid arthritis disease: Systematic review and updated meta-analysis of case-control studies', *Immunobiology*, 220(6), pp. 807–816. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.12.013>.
  129. Too, C.L. *et al.* (2016) 'Occupational exposure to textile dust increases the risk of rheumatoid arthritis: Results from a Malaysian population-based case-control study', *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75(6), pp. 997–1002. Available at: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208278>.
  130. Treiber, G. *et al.* (2015) 'Cholecalciferol supplementation improves suppressive capacity of regulatory T-cells in young patients with new-onset type 1 diabetes mellitus - A randomized clinical trial', *Clinical Immunology*, 161(2), pp. 217–224. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2015.08.002>.
  131. Triantos, C. *et al.* (2018) 'Prognostic significance of vitamin D receptor (VDR)

- gene polymorphisms in liver cirrhosis', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32482-3>.
132. Uitterlinden, A.G., Fang, Y., Van Meurs, J.B.J., *et al.* (2004) 'Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms', *Gene*, 338(2), pp. 143–156. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.05.014>.
  133. Uitterlinden, A.G., Fang, Y., van Meurs, J.B.J., *et al.* (2004) 'Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms', *Gene*, 338(2), pp. 143–156. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.05.014>.
  134. Vesperini, V. *et al.* (2013) 'Association of tobacco exposure and reduction of radiographic progression in early rheumatoid arthritis: Results from a French multicenter cohort', *Arthritis Care and Research*, 65(12), pp. 1899–1906. Available at: <https://doi.org/10.1002/acr.22057>.
  135. Vidal, M., Ramana, C.V. and Dusso, A.S. (2002) 'Stat1-Vitamin D Receptor Interactions Antagonize 1,25-Dihydroxyvitamin D Transcriptional Activity and Enhance Stat1-Mediated Transcription', *Molecular and Cellular Biology*, 22(8), pp. 2777–2787. Available at: <https://doi.org/10.1128/MCB.22.8.2777-2787.2002>.
  136. Wang, T.J. *et al.* (2008) 'Vitamin D Deficiency and Risk of Cardiovascular Disease', *Circulation*, 117(4), pp. 503–511. Available at: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.706127>.
  137. Wang, W. *et al.* (2012) 'The Th17/Treg imbalance and cytokine environment in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis', *Rheumatology International*, 32(4), pp. 887–893. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00296-010-1710-0>.
  138. Wessels, J.A.M., Huizinga, T.W.J. and Guchelaar, H.-J. (2007) 'Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis', *Rheumatology*, 47(3), pp. 249–255. Available at: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kem279>.
  139. Whiting, S.J., Calvo, M.S. and Vatanparast, H. (2017) *Current Understanding of Vitamin D Metabolism, Nutritional Status, and Role in Disease Prevention*. Fourth Edi, *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease*. Fourth Edi. Elsevier Inc. Available at: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802928-2.00043-6>.
  140. World Health Organization (2013) 'Chronic rheumatic conditions', *Chronic diseases and health promotion*. World Health Organization, p. Accessed November 13th, 2013.
  141. Wu, J. *et al.* (1996) '1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub>, and retinoic acid antagonize endothelin-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes.', *Journal of Clinical Investigation*, 97(7), pp. 1577–1588. Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI118582>.
  142. Y, H. *et al.* (2017) '25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> may Function via Genomic and Non-Genomic actions', *Anatomy & Physiology*, 07(04), pp. 3–5. Available at: <https://doi.org/10.4172/2161-0940.1000278>.

143. Zenata, O. and Vrzal, R. (2017) 'Fine tuning of vitamin D receptor (VDR) activity by post-transcriptional and post-translational modifications', *Oncotarget*, 8(21), pp. 35390–35402. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15697>.
144. Zhang, X. *et al.* (2019) 'Elevated circulating IL-17 level is associated with inflammatory arthritis and disease activity: A meta-analysis', *Clinica Chimica Acta*, 496, pp. 76–83. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.06.026>.
145. Zhang, X., Zhang, H. and Shih, D.Q. (2013) 'MECHANISMS UNDERLYING EFFECTS OF 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D 3 ON THE TH17 CELLS', *European Journal of Microbiology and Immunology*, 3, pp. 237–240. Available at: <https://doi.org/10.1556/EuJMI.3.2013.4.1>.
146. Zittermann, A. *et al.* (2009) 'Circulating Calcitriol Concentrations and Total Mortality', *Clinical Chemistry*, 55(6), pp. 1163–1170. Available at: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.120006>.
147. Zmijewski, M.A. and Carlberg, C. (2020) 'Vitamin D receptor(s): In the nucleus but also at membranes?', *Experimental Dermatology*, 29(9), pp. 876–884. Available at: <https://doi.org/10.1111/exd.14147>.