

**EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS DE LA VÍA WNT Y SU ASOCIACIÓN CON  
ÍNDICES DE ACTIVIDAD REUMATOLÓGICA EN PACIENTES CON ARTRITIS  
REUMATOIDE TEMPRANA Y FAMILIARES EN PRIMER GRADO**

**MONICA ALEXANDRA ACEVEDO GODOY**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**BOGOTÁ D.C, COLOMBIA**

**2023**

**EVALUACIÓN DE POLIMORFISMOS DE LA VÍA WNT Y SU ASOCIACIÓN CON  
ÍNDICES DE ACTIVIDAD REUMATOLÓGICA EN PACIENTES CON ARTRITIS  
REUMATOIDE TEMPRANA Y FAMILIARES EN PRIMER GRADO**

**MONICA ALEXANDRA ACEVEDO GODOY**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL  
TÍTULO DE:  
MÁGISTER EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS**

**DIRECTORA:**

MARIA CONSUELO ROMERO SANCHEZ, PhD.

**CO-DIRECTORES:**

SANDRA JANNETH PERDOMO LARA, PhD.

DR. WILSON BAUTISTA, MD, PhD.

**GRUPO DE INVESTIGACIÓN**

Grupo de Inmunología Celular y Molecular – InmuBo – Universidad El Bosque  
Grupo de Inmunología Clínica Aplicada - GICA – Universidad Militar Nueva Granada

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
BOGOTÁ D.C, COLOMBIA**

**2023**



“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, sólo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”

## RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad crónica autoinmune caracterizada por sinovitis aguda y crónica, daño estructural del tejido óseo y del cartílago. El microambiente inmunológico con el que cursa la AR induce el proceso de osteoclastogénesis e inhibe la diferenciación y activación de osteoblastos. El proceso de diferenciación de osteoblastos se encuentra regulado por varias vías, entre ellas la vía canónica Wntless (Wnt/ $\beta$ -catenina). En la AR se ha demostrado que hay una tasa reducida de formación ósea por la inhibición de la diferenciación de osteoblastos mediada principalmente por los antagonistas de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, la proteína Dickkopf-1 (DKK-1) y Esclerostina (SOST), así como altos niveles séricos se han asociado a mayor índice de actividad de la enfermedad y progresión radiológica, adicionalmente, se ha descrito que, variaciones genéticas en los componentes se encuentran asociados a la progresión de la destrucción articular.

Por lo anterior, ya que el compromiso óseo y articular de la AR se ha asociado con la disregulación en la homeostasis ósea mediada por la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina y que los factores genéticos contribuyen a la variación de la severidad de la destrucción articular, este trabajo buscó establecer si las variantes genéticas de los componentes de esta vía de señalización se encuentran asociados con marcadores serológicos y de actividad reumatológica y perfil de auto anticuerpos en pacientes con AR temprana (ART) y familiares de primer grado de consanguinidad comparados con controles sanos.

El estudio incluyó pacientes con diagnóstico de AR temprana, familiares en primer grado de consanguinidad. Se realizó evaluación de índices demográficos y clínicos, marcadores articulares y/o índices de actividad reumática, marcadores serológicos y HLA DRB1. Se realizó la evaluación de las variantes genéticas de los componentes de la Vía Wnt/ $\beta$ -catenina: DKK-1 (rs1896367, rs1896368, rs1528873), SOST rs6503475, LRP-5 rs3736228 y KREMEN rs132774, usando High Resolution Melting y confirmados por secuenciación de Sanger.

Las frecuencias genotípicas y alélicas en pacientes con ART, familiares y controles, presentaron diferencias estadísticas para la variante DKK-1 rs1528873 entre pacientes con ART y controles; mientras que para familiares se encontraron diferencias para la variante de KREMEN y LRP-5 frente al grupo control.

Se presentaron frecuencias alélicas similares a las reportadas en el estudio de los 1000 genomas en población europea y americana, para las variantes DKK-1 rs1896367, rs1896368, KREMEN rs132774 y LRP-5 rs3736228; y similar a la población asiática y africana las variantes DKK-1 rs1528873 y SOST rs6503475; frente a la población de Medellín se encontraron ligeras diferencias frente a nuestra población para las variantes DKK-1 rs1896367, rs1896368 y SOST rs6503475.

No se encontró ninguna variante de la vía Wnt/ $\beta$  como factor de riesgo para el desarrollo de AR o mayor grado de actividad o nivel de anticuerpos. Sin embargo, la variante de SOST, presente en los pacientes con ART diferencias para los anticuerpos anti CarP y PCR, así mismo los haplotipos que incluían la variante de SOST, presentaron tendencia a la significancia frente a articulaciones dolorosas, FR y anti CarP. La combinación de 3, 4 y 5 SNPs se encontraron relacionados con marcadores de inflamación y mayor disfuncionalidad.

En familiares en primer grado de consanguinidad de pacientes con artritis reumatoide no se encontró ninguna variante como factor de riesgo que se asociara con presencia de autoanticuerpos o variables clínicas articulares. Sin embargo, la presencia de SNPs de DKK-1 presentaron diferencias con marcadores de inflamación y niveles de FR, SOST y presentar 3 SNPs se relacionaron con los anticuerpos dirigidos contra péptidos carbamilados, marcadores de inflamación e IMC en el análisis bivariado. Lo cual sugiere evaluar estas variantes en un grupo con mayor tamaño en este grupo de riesgo genético para el desarrollo de artritis reumatoide.

**Palabras claves:** Artritis reumatoide, osteoblasto, Vía Wnt/  $\beta$ -catenina, DKK-1, auto anticuerpos.

## ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease characterized by acute and chronic synovitis, structural damage to bone and cartilage tissue. The immune microenvironment with which RA occurs induces the process of osteoclastogenesis and inhibits the differentiation and activation of osteoblasts. The osteoblast differentiation process is regulated by several pathways, including the canonical Wingless pathway (Wnt/ $\beta$ -catenin). In RA, it has been shown that there is a reduced rate of bone formation due to the inhibition of osteoblast differentiation mediated mainly by the antagonists of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, the Dickkopf-1 protein (DKK-1) and Sclerostin (SOST), as well as high serum levels have been associated with a higher index of disease activity and radiological progression, in addition, it has been described that genetic variations in the components are associated with the progression of joint destruction.

Therefore, since the bone and joint involvement of RA has been associated with dysregulation in bone homeostasis mediated by the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and that genetic factors contribute to the variation in the severity of destruction articular, this work sought to establish whether the genetic variants of the components of this signaling pathway are associated with serological markers and rheumatological activity and self-study profile in patients with early RA (eRA) and first-degree relatives compared with healthy controls.

The study included patients diagnosed with early RA, relatives in the first degree of consanguinity. Evaluation of demographic and clinical indices, joint markers and/or rheumatic activity indices, serological markers and HLA DRB1 was performed. The evaluation of the genetic variants of the components of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway DKK-1 (rs1896367, rs1896368, rs1528873), SOST rs6503475, LRP-5 rs3736228 and KREMEN rs132774 was carried out using High Resolution Melting and confirmed by sequencing of Sanger.

Genotypic and allele frequencies in eRA patients, relatives, and controls presented statistical differences for the DKK-1 rs1528873 variant between eRA patients and controls; while for relatives, differences were found for the KREMEN and LRP-5 variant compared to the control group.

Allele frequencies similar to those reported in the study of 1000 genomes in European and American populations were presented for the DKK-1 rs1896367, rs1896368, KREMEN rs132774 and LRP-5 rs3736228 variants; and similar to the Asian and African population the variants DKK-1 rs1528873 and SOST rs6503475; compared to the Medellin population, slight differences were found compared to our population for the DKK-1 rs1896367, rs1896368 and SOST rs6503475 variants.

No variant of the Wnt/ $\beta$  pathway was found as a risk factor for the development of RA or a higher degree of activity or level of antibodies. However, the SOST variant presented differences in anti-CarP and PCR antibodies in patients with eRA, likewise the haplotypes that included the SOST variant showed a tendency to significance compared to painful joints, RF and anti-CarP. The combination of 3, 4 and 5 SNPs were found to be associated with markers of inflammation and greater dysfunction.

In first-degree relatives of patients with rheumatoid arthritis, no variant was found as a risk factor associated with the presence of autoantibodies or joint clinical variables. However, the presence of DKK-1 SNPs presented differences with inflammation markers and RF levels, SOST and presenting 3 SNPs were related to antibodies directed against carbamylated peptides, inflammation markers and BMI in the bivariate analysis. This suggests evaluating these variants in a larger group in this genetic risk group for the development of rheumatoid arthritis.

**Keywords:** Rheumatoid arthritis, osteoblast, Wnt/  $\beta$ -catenin pathway, DKK-1, autoantibodies.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
1.1. Concepto y clasificación de la artritis reumatoide.....	13
1.2. Patogénesis de la artritis reumatoide .....	14
1.3. Pérdida ósea en artritis reumatoide.....	17
1.4. Vía de señalización Wnt/ $\beta$ - catenina y artritis reumatoide.....	19
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
2.1. Objetivo general.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
<b>3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>26</b>
3.1. Tipo de estudio.....	26
3.2. Población y muestra .....	26
3.3. Evaluación de índices demográficos y clínicos generales .....	29
3.4. Evaluación de marcadores articulares y/o Índices de actividad reumática en pacientes con ART.....	29
3.5. Evaluación de marcadores articulares en familiares en primer grado de pacientes con AR y controles sanos .....	29
3.6. Métodos de laboratorio .....	30
3.7. Evaluación de SNPs mediante High Resolution Melting.....	31
3.8. Análisis estadístico .....	34
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1. Descripción de la población.....</b>	<b>35</b>
4.1.1. Características generales, sociodemográficas y socioeconómicas de pacientes con AR temprana y controles.....	35
4.1.2. Características generales, sociodemográficas y socioeconómicas de familiares de primer grado de pacientes con AR temprana y controles.....	37
4.1.3. Evaluación de la actividad reumática de los pacientes con AR temprana ..	39
4.1.4. Evaluación del perfil de auto anticuerpos de los pacientes con AR temprana.....	39
4.1.5. Evaluación de marcadores inflamatorios y clínicos articulares de los familiares en primer grado de pacientes con AR temprana.....	41
4.1.6. Evaluación del perfil de auto anticuerpos de los familiares en primer grado de pacientes con AR temprana.....	42
<b>4.2. Caracterización de los polimorfismos de la vía Wnt/<math>\beta</math> catenina: DKK-1, SOST, KREMEN, LRP-5 .....</b>	<b>43</b>
4.2.1. Localización genómica de las variantes de los genes DKK-1, SOST, KREMEN y LRP-5 .....	43
4.2.2. Caracterización de las variantes de los genes DKK-1, SOST, KREMEN-1 y LRP-5 por High Resolution Melting, secuenciación de Sanger y electroforesis .....	45
<b>4.3. Frecuencia genotípica y alélica de polimorfismos de los genes DKK-1, SOST, KREMEN Y LRP-5 .....</b>	<b>49</b>
4.3.1. Frecuencia genotípica en pacientes con AR temprana e individuos sanos.....	49

4.3.2.	Frecuencia genotípica en familiares de primer grado de pacientes con ART e individuos sanos.....	50
4.3.3.	Frecuencia alélica en pacientes con AR temprana, familiares de primer grado e individuos sanos .....	51
<b>4.4.</b>	<b>Asociaciones en de los índices de actividad reumática en pacientes con AR temprana y la presencia de polimorfismos de los genes DKK-1, SOST, KREMEN Y LRP-5.....</b>	<b>53</b>
<b>4.5.</b>	<b>Asociación entre el perfil de auto anticuerpos Anti-CCP, Anti CarP, Factor Reumatoide Y HLA en pacientes con AR temprana y familiares de primer grado con la presencia de polimorfismos de los genes DKK-1, SOST, KREMEN Y LRP-5 .....</b>	<b>57</b>
4.5.1.	Pacientes con AR temprana .....	57
4.5.2.	Familiares en primer grado de consanguinidad de pacientes con AR temprana.....	59
4.5.3.	Resultados del análisis multivariado .....	61
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>77</b>
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>78</b>



## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Descripción de SNPs de los componentes de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -Catenina y selección de primers a través del Software Bacon Designer 8.0®

**Tabla 2.** Volumen del ensayo Precision Melt Supermix

**Tabla 3.** Protocolo de PCR y High Resolution Melting

**Tabla 4.** Características sociodemográficas de pacientes con artritis reumatoide temprana y controles

**Tabla 5.** Características sociodemográficas de familiares de primer grado de pacientes con artritis reumatoide temprana y controles

**Tabla 6.** Actividad reumática de los pacientes con artritis reumatoide temprana y controles

**Tabla 7.** Perfil de auto anticuerpos de los pacientes con artritis reumatoide temprana y controles

**Tabla 8.** Evaluación de marcadores inflamatorios y clínicos articulares de los familiares en primer grado de pacientes con AR temprana y controles

**Tabla 9.** Perfil de auto anticuerpos de los familiares en primer grado de pacientes con artritis reumatoide temprana y controles

**Tabla 10.** Frecuencias genotípicas de los componentes de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -Catenina en pacientes con artritis reumatoide temprana y controles sanos

**Tabla 11.** Frecuencias genotípicas de los componentes de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -Catenina en familiares en primer grado y controles sanos

**Tabla 12.** Frecuencias alélicas de variantes de los componentes de los genes DKK-1, SOST, KREMEN y LRP-5 en pacientes con artritis reumatoide temprana, familiares en primer grado y controles sanos

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Transducción de la señal Wnt.

**Figura 2.** Localización genómica de los SNPs de DKK-1 rs1896368, rs1896367 y rs1528873.

**Figura 3.** Localización genómica de los SNPs de SOST rs6503475, KREMEN rs132274 y LRP-5 rs3736228.

**Figura 4.** Variante DKK-1 rs1896368.

**Figura 5.** Variante DKK-1 rs1896367.

**Figura 6.** Variante DKK-1 rs1528873.

**Figura 7.** Variante SOST rs6503475.

**Figura 8.** Variante KREMEN rs132274.

**Figura 9.** Variante LRP-5 rs3736228

**Figura 10.** Análisis de electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplicones obtenidos por PCR

**Figura 11.** A. Comparación de la actividad de la enfermedad medida por DAS28\_VSG >3.2 y SDAI >11 con los genotipos de cada polimorfismo de DKK-1 en pacientes con ART.

**Figura 12.** A. Comparación de la actividad de la enfermedad medida por DAS28\_VSG >3.2 y SDAI >11 con los genotipos de cada polimorfismo en pacientes con ART.

**Figura 13.** MCDA para haplotipo 2 en pacientes con ART.

**Figura 14.** MCDA para DKK-rs1896368 en familiares.

## INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria crónica debilitante que causa daño en cartílago, erosión ósea y deformidades articulares precediendo la limitación de movilidad y por tanto generando un deterioro funcional severo con discapacidad y un alto impacto en la calidad de vida de quien la padece, así como altos costes en salud (Firestein, 2003). Esta enfermedad afecta entre el 0.5% y 1% de la población mundial adulta afecta principalmente a 3 mujeres por cada hombre y se presenta entre la tercera y quinta década de la vida. En población latinoamericana se estima una incidencia de 10-50 individuos afectados por cada 100.000 habitantes (González et al., 2008) y en población colombiana 0.9 por cada 100 habitantes (Díaz-Rojas et al., 2016) y representando el 1.49% de las enfermedades reumáticas inflamatorias más prevalentes en Colombia (Londoño et al., 2018).

Su etiología es desconocida, sin embargo, diversos factores de riesgo que contribuyen a la modificación epigenética, tales como consumo de cigarrillo (Klareskog et al., 2005), agentes infecciosos (Mathew & Ravindran, 2014), el microbioma intestinal (Taneja, 2014); en fases preclínicas explica cerca del 41% del riesgo de presentación de la AR (Alam et al., 2017; Sparks et al., 2014). Por su parte, los factores genéticos contribuyen cerca al 60% de riesgo de AR (MacGregor et al., 2000), siendo el epítipo compartido (EC) del HLA que contribuye a incrementar 3 veces el riesgo de desarrollo de la AR y se le atribuye cerca del 12.7% de riesgos genéticos; sin embargo, diversos estudios de asociación de genoma completo han establecido que el riesgo genético que representa otros loci no HLA, explica cerca del 5.5% del riesgo en la población europea y el 4.7% en la población asiática (Okada et al., 2013). Así mismo, se estima que la heredabilidad del grado de destrucción articular es del 58% (Knevel et al., 2012). Por su parte en población colombiana el epítipo compartido expresado en el HLA DRB1\*04 se encuentra principalmente asociado al desarrollo de AR (Anaya JM et al., 2002) y se ha asociado con un aumento del 56% de riesgo de daño articular (Rojas-Villarraga A et al., 2009).

Dado el compromiso óseo y la disregulación de la homeóstasis entre formación y resorción ósea, la vía Wnt/ $\beta$ -Catenina ha cobrado interés en el estudio de la AR, así como el estudio de las variantes genéticas de los reguladores de esta vía, DKK-1, SOST, LRP-5 y KREMEN-1, asociados a la progresión de la destrucción articular (De Rooy et al., 2013); estudios previos de las variantes de DKK-1 en nuestra población indican que los pacientes que tienen la variante rs1896367 presentan mayor

compromiso radiológico, mientras que la variante rs1896368 confiere protección frente al daño radiológico en pacientes con AR (Cardona et al., 2020).

El daño articular y la severidad en el compromiso óseo es el principal factor pronóstico de la enfermedad, por tanto se ha direccionado la búsqueda para encontrar nuevos biomarcadores predictores que permitan identificar precozmente tanto el riesgo de desarrollar AR como la severidad de esta, y redirigir el tratamiento en función del riesgo de la progresión radiológica, así como profundizar en los mecanismos de la etiopatogenia de la enfermedad; de allí la importancia de la detección de factores genéticos y sus posibles variaciones genéticas relacionadas con la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, que se encuentra involucrada en la homeóstasis y remodelación ósea en población de riesgo colombiana en fases pre clínicas y en fases tempranas de la enfermedad.

Adicionalmente, los estudios del perfil genético asociado a la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en población colombiana en individuos sanos como en individuos con AR, son limitados y ausentes en familiares en primer grado, por lo anterior, la pertinencia de seguir ampliando la caracterización de la patogénesis de la enfermedad.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. Concepto y clasificación de la artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad de naturaleza autoinmune caracterizada por manifestaciones de inflamación crónica que resulta en la destrucción principalmente de las articulaciones sinoviales generando de manera progresiva lesiones estructurales, deterioro funcional, discapacidad, disminución de la calidad de vida, así como manifestaciones extra articulares cardiovasculares, pulmonares, óseas y psicológicas, aumentando la morbilidad y mortalidad prematura y los altos costos socioeconómicos (Machado-Alba et al., 2015; Firestein, 2003).

La AR cursa principalmente con hiperplasia, dolor e inflamación poliarticular y simétrica, afectando inicialmente las articulaciones diartrodiales como hombro, rodilla, cadera, metacarpofalángicas y carpos, que puede progresar generando deformidad, dada la destrucción ósea y del cartílago (McInnes et al., 2011). La producción de auto anticuerpos (Anticuerpos anti péptido citrulinado: Anti-CCP y factor reumatoide: FR) y de reactantes de fase aguda, pueden preceder la presentación clínica de la enfermedad, hasta 18 años antes del diagnóstico de la misma (Berglin et al., 2004; Jorgensen et al., 2008).

La clasificación de la AR según los criterios propuestos por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) y la Liga Europea Contra el Reumatismo (EULAR) en el 2010 incluye: el hallazgo de sinovitis en al menos 1 articulación con la ausencia de otras posibles causas de la sinovitis, el puntaje individual obtenido frente al número y sitio de las articulaciones afectadas, anormalidades serológicas, reactantes de fase aguda (PCR: Proteína C reactiva y VSG: Velocidad de sedimentación globular) elevados y duración de los síntomas (Aletaha et al., 2010). Por su parte, la clasificación de AR temprana, históricamente fue considerada para individuos con menos de 24 meses de enfermedad, con especial énfasis en los primeros 12 meses (Emery, 1994); sin embargo, la definición de AR temprana ha sido también utilizada en relación a síntomas menores a 3 meses (Aletaha D. et al., 2002). Por su parte, EULAR en 2012 con el fin de facilitar la investigación en los estadios preclínicos y en las fases tempranas de la AR establece que para estudios prospectivos los individuos sin AR deben estar limitados en las siguientes categorías: factores genéticos, factores ambientales, autoinmunidad sistémica relacionada con AR, síntomas clínicos sin AR,

y artritis no clasificada; estos pueden ser usados de manera combinada y serán categorizados bajo el prefijo de “Pre AR” (Gerlag, et al., 2012).

## **1.2. Patogénesis de la artritis reumatoide**

La etiología de la AR es multifactorial, se ha postulado que factores medioambientales y modificaciones epigenéticas en individuos con predisposición genética, contribuyen al desarrollo de la enfermedad. En la fase pre clínica los factores genéticos se encuentran relacionados con la susceptibilidad y severidad de la AR (McInnes et al., 2011).

La historia familiar ha sido reconocida como uno de los mayores riesgos para el desarrollo de la AR; estudios previos llevados a cabo en gemelos, ha permitido caracterizar la contribución genética como uno de los factores participantes de la enfermedad, estimando un porcentaje de heredabilidad cerca del 60% (MacGregor et al., 2000); adicionalmente un estudio realizado en población sueca sobre riesgos familiares y heredabilidad en el grupo familiar, reveló que el riesgo familiar es el mismo entre hermanos, padres e hijos, afectando ~3 familiares de primer grado y ~2 de segundo grado, relacionando el riesgo familiar con el 50% de heredabilidad en pacientes con AR y anti CCP positivo y un 20% de heredabilidad de pacientes con AR anti CCP negativo (Frisell et al., 2013).

El principal factor genético asociado a la predisposición y la severidad de la AR es el denominado “epítoto compartido” (EC) del HLA (Human Leucocyte Antigen), una secuencia que comparte residuos de aminoácidos similares en la posición 70 a 74 de la cadena beta de los alelos correspondientes al HLA DRB1, esta secuencia contribuye a incrementar 3 veces el riesgo de desarrollo de la AR (Gregersen et al., 1987) y se le atribuye cerca del 12.7% de riesgos genéticos (Raychaudhuri et al., 2012); comparado con el 5.5% y 4.7% en población europea y asiática respectivamente que representa otros loci (Okada et al., 2013). En población colombiana se ha evidenciado que el EC QRRAA expresado en el HLA DRB1\*04 se encuentra asociado al desarrollo de AR (Anaya JM et al., 2002), adicionalmente la presencia de EC se ha asociado con un aumento del 56% de riesgo de daño articular (Rojas-Villarraga A et al., 2009). En familiares de primer grado de consanguinidad de pacientes con AR el EC se encuentra en el 52%, principalmente el HLA DRB1\*0405 en el 26.3% (Chila Moreno L et al., 2020).

Estudios de asociación de genoma (GWAS: Genome-wide association studies) han permitido el hallazgo de genes ligados a enfermedades, identificando 100 loci asociados con susceptibilidad genética para AR, entre los alelos más relevantes de susceptibilidad se encuentran HLA-DRB1, PTPN22, TRAF1/C5, STAT4, PADI4, IRF5, FCGR, IL2RA, IL2RB, CD40, CCL21, CCR6 (Yarwood et al., 2016; Kurkó et al., 2013). Por otra parte se han identificado múltiples polimorfismos asociados con genes candidatos biológicos plausibles o la cercanía con el gen, entre los que se encuentran HLA-DRB1, C5orf30, IL2RA, IL2RB, SPAG16, CD40, TNF- $\alpha$ , IL-4R, DKK-1, MMP-9, CCR5, FCRL3, PADI4, LILRA3, Osteoprotegerina, HUNK / SCAF4 y PTGER4, entre otros; que han permitido evaluar progresión de la enfermedad, asociándose con resultados de compromiso radiográfico, (Viatte et al., 2017).

La susceptibilidad genética contribuye de manera importante al desarrollo de la AR, dado que los polimorfismos genéticos pueden influir en la actividad reguladora, transcripcional, splicing, ARNm, estabilidad proteica o modificaciones traduccionales o post traduccionales; sin embargo, factores medioambientales y cambios epigenéticos de individuos genéticamente predispuestos, se encuentran relacionados con la pérdida de la tolerancia inmunológica que progresan a procesos autoinmunes (Chung et al., 2016).

El consumo de cigarrillo es considerado como un factor de riesgo para el desarrollo de AR, representando un riesgo 40% más alto entre fumadores y no fumadores (Sugiyama et al., 2009). El consumo de cigarrillo promueve el proceso de citrulinación, una modificación postraduccional en la cual una arginina es convertida a citrulina por la reacción enzimática de la proteína arginina deiminasa 4 (PAD4) en presencia de altas concentraciones de calcio; tal modificación sobre proteínas propias como vimentina, colágeno, queratina  $\alpha$ -enolasa, fibronectina y fibrinógeno, genera neoepítomos que son reconocidos por alelos del HLA-DRB1 previamente descrito, contribuyendo en la generación de anticuerpos anti-CCP (Klareskog et al., 2005; De Rycke, 2004), considerándose estos anticuerpos como marcadores de diagnóstico y factor pronóstico de la instauración de la AR y asociándose con el grado de destrucción articular (De Rooy et al., 2010). Estudios previos in vitro y en modelos murinos han descrito que los anticuerpos anti-CCP pueden inducir la diferenciación y activación de osteoclastos a través de la expresión del receptor Fc $\gamma$ , sugiriendo que la presencia de estos anticuerpos podría explicar la pérdida ósea en las fases tempranas de la artritis inflamatoria crónica (Krishnamurthy et al., 2015, Harre et al., 2012). Por su parte, en familiares de primer grado de pacientes con AR, Barra et al. evaluaron la presencia de anticuerpos anti-CCP, demostrando una

mayor prevalencia, cerca del 48% comparado con controles que representa un 10% (Barra et al., 2013).

En adición a los anti-CCP, otros auto anticuerpos estudiados en la AR son los anticuerpos anti proteínas carbamiladas (Anti CarP). La carbamitación es una modificación postraduccional que involucra la conversión de lisina a homocitrulina, inducida por el cianato y cuya estructura es similar a la citrulina. El proceso de carbamitación es catalizado por la mieloperoxidasa liberada por los neutrófilos en estados inflamatorios, y en fumadores se oxida el tiocianato induciendo mayor carbamitación (Wang Z. et al., 2007). Shi et al., demostraron que cerca del 45% de los pacientes con AR presentan Anti CarP de isotipo IgG y el 43% del Isotipo IgA; así mismo, demostraron que pacientes seronegativos para anti-CCP, la presencia de anticuerpos anti CarP fue predictivo para un curso de la enfermedad más severo (Shi J. et al., 2011). Por su parte, Regueiro C. et al., evidenciaron que pacientes con un título altamente positivo de anticuerpos anti CarP presentaron una disminución de la densidad mineral ósea de la medula espinal y cadera, pero no en el hueso yuxta articular de las articulaciones metacarpofalángicas (Regueiro et al., 2018). Un estudio en población indígena norteamericana demostró que los anticuerpos anti CarP se encontraban incrementados en pacientes con AR (44.3%) y en familiares de primer grado un 18.3%, frente a un 4.7% presente en sujetos controles sanos, sugiriendo una posible evolución del proceso autoinmune en estados preclínicos de la enfermedad (Koppejan et al., 2016); así mismo, en población colombiana, se evidencio que los Anti CarP se encuentran en mayor frecuencia, entre un 25% a 33% en familiares de primer grado, frente a un 11% a 14% en sujetos sanos, y se asociaron con la presencia de articulaciones dolorosas, incremento de los niveles de PCR y FR; sugiriendo estos auto anticuerpos como biomarcadores tempranos para el desarrollo de AR (Chila Moreno L et al., 2020).

Por su parte, la obesidad o sobrepeso, es considerado como otro factor de riesgo en la AR; más del 50% de los pacientes con AR presenta sobrepeso u obesidad (Naranjo et al., 2008), los pacientes con AR exhiben un estado crónico subclínico inflamatorio, dado que el tejido adiposo es un órgano dinámico que secreta diversos mediadores biológicos que incluyen factores de complemento (Vlaicu et al., 2016), adipocinas y citoquinas pro inflamatorias tales como factor de necrosis tumoral (Tumor necrosis factor: TNF- $\alpha$ ), interleuquina 6 (IL-6), leptina, resistina y vifastina; mientras que, la adiponectina, según su forma molecular se puede comportar como anti inflamatoria o pro inflamatoria (Tilg & Moschen, 2006); los ácidos grasos libres han demostrado aumentar la secreción de IL-6, IL-8, Proteína quimioattractante de



monocitos (Monocyte chemoattractant protein-1: MCP-1), así como enzimas de degradación de la matriz (matrix metalloproteinase: MMP1 y MMP3) en sinoviocitos tipo fibroblastos (Fibroblast-like synoviocytes: FLS) de pacientes con AR, contribuyendo a la inflamación y destrucción articular (Frommer et al., 2015) .

Respecto a la asociación entre la obesidad y la presentación AR, se han obtenido resultados discordantes, algunos estudios refieren que la obesidad incrementa la actividad de la enfermedad (Stavropoulos-Kalinoglou et al., 2008; García-Poma et al., 2007; de Resende Guimarães et al., 2019) y se asocian los niveles séricos de adiponectina con una progresión radiográfica temprana en pacientes con AR temprana (Meyer M. et al., 2013). Por su parte, en población colombiana se encontró que altos niveles de leptina, vaspina e IL-6 se encuentran asociados con el diagnóstico de AR temprana, de la misma manera que se evidenció mayores niveles de leptina en familiares de primer grado que presentaban articulaciones inflamadas, por tanto el incremento de los niveles de adipocinas podría modular la actividad de la enfermedad (Chaparro-Sanabria JA. et al., 2019; Rodríguez J. et al., 2020); contrariamente, otros estudios evidencian que la obesidad se asocia con menor daño radiológico articular (Vidal et al., 2015; Baker et al., 2014; Gharbia et al., 2018).

### **1.3. Pérdida ósea en artritis reumatoide**

El daño anatómico articular en los pacientes con AR conlleva a mayor progresión radiológica y se encuentra relacionado con deterioro funcional; el desarrollo de erosiones se observa entre el 10% y el 26% en los pacientes con AR, en un lapso de 3 meses, mientras que cerca del 75% de los pacientes progresan al daño radiológico en los dos primeros años posterior al diagnóstico de la enfermedad, por lo que el control de la progresión es uno de los principales objetivos del tratamiento adecuado y oportuno de la enfermedad (Machold et al., 2006).

El individuo que padece AR presenta 3 formas diferentes de daño óseo: Pérdida ósea local, que afecta las articulaciones adyacentes al sinovio inflamado; pérdida ósea periarticular adyacente a las articulaciones inflamadas que usualmente es evidente al inicio de la enfermedad y por último la pérdida ósea sistémica que incluye la osteoporosis y osteopenia (Zerbini et al., 2016).

El término osteoimmunología se ha acuñado al proceso de interacción entre los procesos inmunes y el remodelamiento óseo (Arron & Choi, 2000), en la AR, el

proceso inflamatorio ocurre concomitantemente con la pérdida ósea; la expresión de citoquinas pro inflamatorias en el sinovio inflamado induce osteoclastogénesis e inhibe la diferenciación de osteoblastos. El tejido sinovial inflamado muestra hiperplasia de la capa de revestimiento de la íntima dado el aumento de la tasa de proliferación de sinoviocitos tipo fibroblastos y macrófagos; en la capa sub íntima del sinovio se evidencia neo angiogénesis con activación endotelial y migración de células inmunes tales como macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B, mastocitos y neutrófilos (Van de Sande et Baeten, 2015) que han sido reclutados a través de moléculas de adhesión como integrinas, selectinas y quimioquinas. La reorganización de la membrana sinovial, el microambiente y la activación local de fibroblastos, perpetúa el proceso inflamatorio dejando en la formación del pannus (McInnes et al., 2011).

Dentro del infiltrado sinovial, los macrófagos se encuentran en alta proporción dada su excesiva activación y proliferación; interactúan con el microambiente inflamatorio, y tras ser activados producen citoquinas tales como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , promoviendo el reclutamiento celular, activando los fibroblastos y facilitando la polarización de células T (Yang et al., 2020); adicionalmente, pueden actuar como células presentadoras de antígenos, que estimulan la célula T y contribuye al daño articular, correlacionándose con progresión radiológica de la destrucción articular (Udalova et al., 2016; Kinne et al., 2007).

De otra forma, la activación de los linfocitos T CD4+ a través del HLA II- péptido-TCR, permite la diferenciación a linfocito efector Th1, liberando IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$ , y TNF- $\beta$  (McInnes et al., 2011). TNF- $\alpha$  es considerado un clave inductor de la destrucción ósea, ya que regula la expresión del ligando activador del receptor NF-KB (RANKL: Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand ) y del factor estimulador de colonia de macrófago (M-CSF: Macrophage Colony Stimulating Factor) determinantes en el proceso de osteoclastogénesis, mientras que M-CSF actúa como un factor de supervivencia, RANKL y su interacción con el receptor RANK de células del linaje monocito/macrófago y de células precursoras de osteoclastos, determina el proceso de diferenciación a osteoclastos funcionales que son los culpables de la resorción ósea presente en la enfermedad (Asagiri & Takayanagi, 2007).

Estudios previos han determinado que el tratamiento con anti TNF- $\alpha$  (Infliximab) demuestra un mejoramiento en la actividad de la enfermedad a través del DAS28 y

la disminución del volumen de la erosión ósea (Shimizu et al., 2019; Vis et al., 2006). La unión de RANKL a su receptor RANK inicia la activación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa-B (NF-KB), c-Fos y el Factor nuclear de células T activadas c1 (NFATc1), siendo este el principal factor de transcripción para la osteoclastogénesis (Takayanagi, 2005). En condiciones fisiológicas el osteoblasto es el principal productor de RANKL y del antagonista osteoprotegerina (OPG); en la AR, el ratio RANKL/OPG se encuentra elevado y se asocia con una fuerte progresión ósea (Van Tuyl et al., 2010).

El proceso de resorción ósea es iniciado por la liberación de protones por la vía H<sup>+</sup>ATPasa, catepsina K, metaloproteínasa de matrix 9 (MMP-9) y fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP: Tartrate-resistant acid phosphatase) que acidifican la microcavidad y contribuye a la desintegración de la hidroxiapatita de calcio, el colágeno y otras proteínas que forman la matriz ósea, conllevando a un proceso de resorción excesiva característico de la enfermedad (Shaw & Gravallese, 2016). Paralelamente, la formación ósea por parte de los osteoblastos es insuficiente para el alto grado de resorción generada por los osteoclastos, como lo demuestra Walsh et al., en un modelo murino de AR, donde se evidencia que el grado de formación ósea en superficies adyacentes a la articulación inflamada es similar a la observada en huesos no afectados, sin embargo, se observó una baja tasa de células del linaje de osteoblastos en la etapa media tardía que expresan el marcador de fosfatasa alcalina aun cuando había la presencia de células tempranas que expresaban el factor de transcripción pro-osteogénico Runx2 (Walsh et al, 2009) lo que sugiere que existe alteración en la diferenciación y activación de osteoblastos.

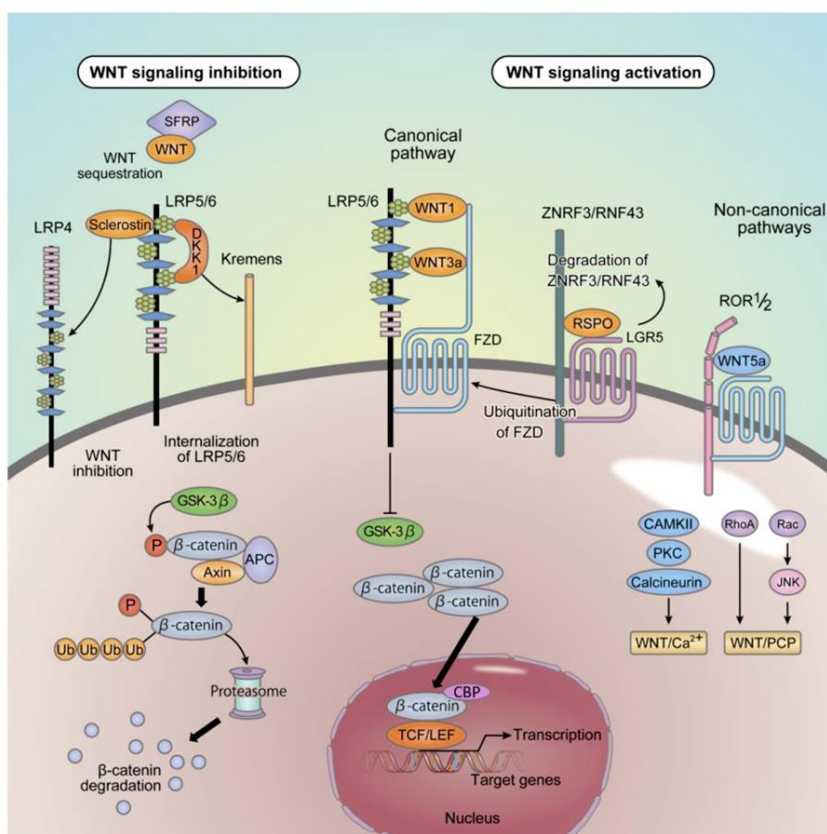
#### **1.4. Vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina y artritis reumatoide**

Los osteoblastos son derivados de células precursoras mesénquimales cuyo proceso de diferenciación se encuentra regulado por la vía de la proteína morfogénica ósea (BMP: Bone Morphogenetic Protein) y la vía canónica Wingless (Wnt) (Shaw & Gravallese, 2016).

La vía de señalización Wnt se encuentra relacionada no solo con los procesos óseos sino también en la embriogénesis, organogénesis y tumorigénesis (Wodarz & Nusse, 1998; Kim et al., 2013); esta vía actúa a través de dos vías separadas, la vía canónica o  $\beta$ -catenina y la vía no canónica dependiente de Ca<sup>2+</sup>. La vía de

señalización Wnt/ $\beta$ -catenina requerida para la diferenciación y activación de osteoblastos comprende la interacción específica de la proteína Wnt con uno de los 10 miembros de la familia de los receptores Frizzled (Fz) , induciendo la fosforilación de las lipoproteínas de baja densidad 5/6 (LRP-5/6: low-density lipoprotein receptor-related protein); este complejo activa a Disheveled, una proteína que captura la axina, tras la captura de la axina se impide la formación del complejo de degradación, por lo tanto hay un aumento citoplasmático de  $\beta$ -catenina que posteriormente se transloca a núcleo y da inicio a la transcripción de genes, dentro de los que se incluye Runx2. En la inhibición de la vía, la  $\beta$ -catenina es fosforilada por la glucógeno sintasa quinasa- $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) mientras se encuentra unida a la axina, poliposis adenomatosa (APC) y caseína quinasa  $\alpha$  (CK  $\alpha$ ), formando el complejo que es ubiquitinado y llevado al proteosoma para su degradación (Walsh et al, 2009).

La inhibición de esta vía esta mediada por diversos antagonistas, entre ellos, las proteínas relacionadas a Frizzled (sFRP) que se une a dos moléculas Wnt a través de sus dominios impidiendo la unión al complejo receptor; la Esclerostina expresada en osteocitos se une a LRP e impide la unión de las proteínas Wnt; y las proteínas de la familia Dickkopf (DKK) principalmente DKK-1 que se relaciona con el metabolismo óseo, el cual se une a LRP y evita la unión Wnt- Fz-LRP; también, DKK-1 junto con la proteína KREMEN-1 se une a LRP y forma un complejo que es internalizado, de manera que se reduce la disponibilidad de LRP (Piters et al., 2008). Ver figura 1.



**Figura 1. Transducción de la señal Wnt.**

Tomado de: Maeda, K., Kobayashi, Y., & Koide, M. (2019). The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling. *International Journal Of Molecular Sciences*, 20(22), 5525. doi: 10.3390/ijms20225525

La vía Wnt/ $\beta$ -Catenina ha cobrado interés en el estudio de la AR, Xiao et al., demostró que la expresión de  $\beta$ -catenina en tejido sinovial y en fibroblastos tipo sinoviocitos se encuentra significativamente alta (Xiao et al., 2010). En modelos murinos de AR se ha encontrado niveles séricos elevados de DKK-1 y la utilización de anticuerpos neutralizantes contra DKK-1 contribuye al cambio del patrón destructivo óseo a un patrón de formación ósea (Diarra et al., 2007). En fases iniciales de la AR se han observado mayores títulos de DKK-1 en sinoviocitos tipo fibroblastos que, en AR establecida, sugiriendo un papel patogénico temprano en el desarrollo y perpetuación de la enfermedad (Juarez et al., 2016). Diversos estudios han demostrado que los niveles séricos de DKK-1 en sujetos con AR se encuentran más elevados respecto al grupo control y otras patologías de compromiso óseo como osteoartritis y espondilitis anquilosante, y presentan una correlación significativa con VSG, PCR y el índice de actividad de la enfermedad DAS28 (Disease activity score); lo que propone que podría ser un biomarcador temprano que contribuye a predecir el desenlace de la enfermedad (Diarra et al., 2007; Wang

et al., 2011; Garnero et al., 2008; Seror et al., 2016; Gómez-Vaquero et al., 2016). En población colombiana, los niveles séricos de DKK-1 fueron comparados en grupos de pacientes con AR, evaluando el índice de actividad de la enfermedad y el estado funcional, evidenciándose que altos niveles séricos de DKK-1 no se encontraron asociados con el índice de actividad, sin embargo, se asoció con bajos niveles de funcionalidad, destrucción articular, altos títulos de factor reumatoide y consumo de cigarrillo (Santos AM et al., 2018), por su parte el estudio realizado por Cardona et al., no se encontró niveles séricos de DKK-1 asociados a la actividad de la enfermedad ni al daño radiológico en fases tempranas, de igual manera, no hubo diferencias relacionadas con los niveles de DKK-1 y la presencia de anticuerpos anti CCP, ni biomarcadores como VSG, PCR, FR y el conteo de articulaciones dolorosas o inflamadas (Cardona-Rincón et al., 2020).

Por otra parte, desórdenes esqueléticos relacionados con los niveles de Esclerostina (SOST) han sido descritos en otras patologías como la esclerosteosis, la enfermedad de Van Buchem, la osteoartritis y la espondilitis anquilosante (Van Lierop et al., 2011; Balemans et al., 2001; Staehling-Hampton et al., 2002; Appel et al., 2009); en modelos animales se ha evaluado el rol que juega la SOST y el blanco potencial que puede representar para el tratamiento de la osteoporosis y otros desórdenes relacionados con baja densidad mineral ósea (Lewiecki, 2013). En la AR se han encontrado estudios discordantes respecto a SOST, Chen et al., evaluó si la inhibición de SOST protegía del daño óseo y del cartílago en un modelo murino de artritis inflamatoria, evidenciándose que tal inhibición bloqueó completamente y reversó la pérdida ósea sistémica en columna y pérdida ósea periarticular en la tibia proximal (Chen et al., 2013),

Por su parte, Wehmeyer et al., demostraron que hay una sobre expresión de SOST en el tejido sinovial de pacientes con AR comparado con otras osteoartritis (Wehmeyer et al., 2010); Terpos et al., encontraron un incremento en los niveles séricos de SOST comparado con controles, Singh et al., evidenció niveles séricos de SOST significativamente altos y una correlación significativa con los índices de actividad de la enfermedad (DAS28 y MHAQ), así como con los niveles de VSG y PCR (Terpos et al., 2011); por el contrario, Sahoo et al., evidenció que aunque los niveles en suero de SOST se encontraban elevados, no había correlación significativa con la actividad de la enfermedad ni la densidad mineral ósea (Sahoo et al., 2016). En el meta análisis realizado por Shi et al., se evaluaron 3 estudios que incluían 145 pacientes con AR y 127 controles sanos y reveló que no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de SOST en pacientes con AR y controles

(Shi et al., 2017). Por otro lado, la expresión de SOST parece estar positivamente correlacionada con los niveles de Dkk-1 (Heiland et al., 2010).

LRP-5 es uno de los reguladores del remodelamiento óseo más estudiados de la vía Wnt/  $\beta$ -catenina, la pérdida de su función por mutaciones causa el síndrome de osteoporosis-pseudoglioma (Gong et al., 2001), mientras que las mutaciones activadoras en LRP-5 causan síndrome de aumento de la masa ósea (Boyden et al., 2002). Los hallazgos de los niveles de LRP-5 y KREMEN-1 en pacientes con AR son limitados.

La progresión radiológica es el principal factor pronóstico de severidad de la AR, su diagnóstico y seguimiento es realizado mediante radiografía simple que es evaluada empleando diversas escalas de puntuación para determinar tanto el daño óseo y articular como su relación con el pronóstico y actividad clínica de la enfermedad (Kellgren & Lawrence, 1957; Sharp et al., 1971; Larsen et al., 1977).

En los pacientes con AR, diversos estudios han demostrado que hay mayor progresión radiológica cuando hay niveles elevados de DKK-1 (Garnero et al., 2008; Liu et al., 2010; Seror et al., 2016), sin embargo, la variación de la destrucción articular entre pacientes es explicada en un 32% por los factores de riesgo asociados a inflamación y auto anticuerpos, no obstante, la identificación de riesgos genéticos individuales asociados con la variación de la severidad de la destrucción articular ha cobrado gran interés (de Rooy et al., 2010).

Rooy et al., estudiaron las variantes genéticas de los reguladores de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, DKK-1, SOST, LRP-5 y KREMEN-1, asociados a la progresión de la destrucción articular, su estudio incluyó cuatro cohortes europeas (Leiden-NED, Groningen-NED, Sheffield-UK y Lund-SWE) en las cuales se analizaron 8 polimorfismos para DKK-1, 44 polimorfismos para LRP-5, 16 para KREMEN-1 y 9 para SOST; se realizaron modelos de regresión para establecer asociación entre los polimorfismos y los niveles séricos, así como progresión radiológica por dos diferentes puntajes (Sharp van der Heijde y Larsen). En los resultados observaron que en la cohorte de Leiden seis SNPs (single nucleotide polymorphisms) de DKK-1, tres de Esclerostina, uno de KREMEN-1 y diez de LRP-5 se asociaron significativamente con progresión de daño articular; posteriormente en el meta análisis realizado, 3 SNPs de DKK-1 (rs1896367, rs1896368, rs152873) se asociaron significativamente a la progresión del daño articular, un SNP de DKK-1 se asoció a mayores niveles séricos (rs1896368,  $p=0.02$ ) (de Rooy et al., 2013). Posteriormente Miceli-Richard C et al., evaluaron estas variaciones en una cohorte

francesa de AR temprana ESPOIR, sin embargo, ninguno de los 10 SNPs para DKK-1 analizados se asoció significativamente con el puntaje de SvH modificado tanto al inicio del seguimiento como al año y a los 2 años (Miceli-Richard et al., 2015). El estudio de los SNPs asociados a progresión radiológica fue evaluado por Cardona et al., en población colombiana evidenciándose que individuos heterocigotos para rs1896367 tenían más erosión y estrechamiento del espacio articular en pies, mientras que los individuos homocigotos para rs1896368 presentaban menos frecuencia de erosión y estrechamiento del espacio articular (Cardona et al., 2020).

Respecto a la Esclerostina, Seror et al., en el año 2016, no encontraron niveles de SOST asociados a ningún parámetro de actividad de la enfermedad ni al daño estructural articular. Sin embargo, en otras patologías como la esclerosteosis, se ha descrito, que la mutación en el gen que codifica para la proteína SOST, causa una pérdida de su función en el proceso de inhibición de la vía Wnt/ $\beta$ catenina conllevando a una producción excesiva ósea (Van Lierop et al., 2011), así como en la enfermedad de Van Buchem, donde la delección en este mismo gen resulta en la producción defectuosa de esta misma (Staebling-Hampton et al., 2002).

El estudio de SOST y su relación con la AR, de Rooy et al., encontró que de los 3 SNPs asociados a la progresión del daño articular, 2 SNPs de SOST tuvieron tendencia a la significancia estadística (rs4792909 and rs6503475,  $p=0.07$ ) (De Rooy et al., 2013). De igual forma, Athanasiadis et al., encontró que en la región genómica de SOST y el SNPs rs4792909 se encuentra asociado a rasgos relacionados con la osteoporosis (Athanasiadis et al., 2014). Lo anterior sugiere la importancia de las variaciones genéticas de SOST en procesos metabólicos óseos.

Por otro lado, Rooy et al., encontró 10 SNPs de LRP-5 asociados significativamente con progresión radiológica en la primera fase del estudio, sin embargo, en la fase dos, solo un SNP fue evaluado (rs3736228), y este no tuvo asociación con la progresión del daño articular. Por su parte, M. Bernardes et al., evidencian que los SNPs (p. A1330V, p. N740N, p. V667M) presentan una asociación significativa con la severidad de la destrucción articular en pacientes con AR. Finalmente, con respecto a KREMEN-1 se analizaron 16 SNPs, 3 fueron asociados con la destrucción articular en la primera fase en AR, sin embargo, el SNP rs32774 mostró una tendencia hacia la significancia, pero esta se perdió posterior a las correcciones estadísticas (De Rooy et al., 2013).



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Evaluar la presencia de polimorfismos de la vía Wnt y su asociación con índices de actividad reumatológica en pacientes con artritis reumatoide temprana y familiares en primer grado.

### **2.2. Objetivos específicos**

2.2.1. Establecer la frecuencia genotípica y alélica de polimorfismos de los genes DKK-1, SOST, KREMEN-1 y LRP-5 en pacientes con AR temprana y en familiares de primer grado.

2.2.2. Comparar la frecuencia genotípica y alélica de polimorfismos de los genes DKK-1, SOST, KREMEN-1 y LRP-5 en pacientes con AR temprana y en familiares de primer grado frente a controles sistémicamente sanos.

2.2.3. Evaluar la asociación entre los índices actividad reumática y los polimorfismos de DKK-1, KREMEN-1, SOST y LRP-5 en pacientes con AR temprana.

2.2.4. Evaluar la asociación entre anticuerpos anti péptido citrulinado, anticuerpos anti-carbamilados, factor reumatoide, HLA, con polimorfismos de DKK-1, KREMEN-1, SOST y LRP-5, en pacientes con AR temprana y en familiares en primer grado de pacientes con artritis reumatoide.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Tipo de estudio**

Estudio de corte transversal

#### **3.2. Población y muestra**

Se incluyeron pacientes con diagnóstico de AR temprana de menos de dos años de evolución y familiares en primer grado de consanguinidad (hijos), los cuales fueron atendidos por los servicios de reumatología del Hospital Militar Central, Fundación Instituto de Reumatología Fernando Chalem desde enero de 2015 hasta enero de 2018. Con una tasa de participación del 80 % y que participaron voluntariamente en el estudio: Seguimiento de la actividad clínica reumática en individuos con riesgo de desarrollar Artritis Reumatoide y de pacientes en estados tempranos de la enfermedad asociados a indicadores - Colciencias 657- 2014 y en el estudio aprobado por convocatoria interna del Hospital Militar Central, "Asociación de marcadores óseos y anticuerpos anti carbamilados relacionados con índices periodontales y de actividad reumatológica en pacientes con AR temprana y en familiares en primer grado de pacientes con AR" convocatoria 2015- 047 en Bogotá.

Los pacientes fueron clasificados de acuerdo a los criterios clasificatorios de AR según Colegio Americano de Reumatología y EULAR 2010 (Aletaha et al., 2010).

No se realizó cálculo muestral, debido a que la población de estudio que cumple con el diagnóstico temprano de menos de dos años de la enfermedad es limitado y no oportuno, dado las condiciones propias del sistema de salud y la ausencia o inespecificidad de la sintomatología para ser diagnosticados con AR de manera temprana, por lo anterior se realiza muestreo a conveniencia y se incluyen la totalidad de los individuos que cumplan con criterios de inclusión y deseen participar en los estudios previamente mencionados.

Se determino que tanto los pacientes como los familiares contarán con al menos 3 generaciones de ascendencia colombiana, para asegurar que fueran mestizos colombianos.

## **Criterios de inclusión**

### **Criterios de inclusión para pacientes con ART**

Pacientes mayores de 18 y menores de 65 años con criterios clasificatorios de AR según Colegio Americano de Reumatología y EULAR de 2010, (pacientes de menos de dos años de evolución de la enfermedad), con tratamiento convencional.

### **Criterios de Inclusión para grupo de riesgo para desarrollar AR**

Individuos colombianos sistémicamente sanos mayores de 18 y menores de 65 años relacionados familiarmente en primer grado de consanguinidad con pacientes con AR. Según guía de recomendaciones del consenso europeo de reumatología (EULAR) de 2012.

### **Criterios de Inclusión para grupo control sanos**

- Individuos sanos mayores de 18 y menores de 65 años que se encuentren bajo circunstancias laborales o ambientales similares a los pacientes seleccionados.
- Individuos que firmen el consentimiento informado voluntariamente.

## **Criterios de exclusión**

### **Criterios de exclusión para pacientes con ART**

- Individuos con proceso infeccioso en curso o diagnóstico de neoplasia.
- Individuos con diagnóstico de diabetes mellitus.
- Pacientes que se rehúsen entrar al estudio y por tanto no firmen el consentimiento informado.
- Pacientes con dificultades para completar la información pertinente.
- Pacientes que se encuentren bajo tratamiento antibiótico tres meses previos a la toma de las muestras.
- Pacientes en embarazo o lactancia.

### **Criterios de Exclusión para grupo de riesgo para desarrollar AR**

- Individuos con proceso infeccioso en curso, o con diagnóstico de neoplasia o enfermedad autoinmune.
- Individuos con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2.
- Individuos que se rehúsen entrar al estudio y por tanto no firmen el consentimiento informado.

- Individuos con dificultades para completar la información pertinente.
- Pacientes que estén recibiendo antibiótico en los últimos 3 meses.
- Individuos en embarazo o lactancia.

### **Criterios de Exclusión para grupo control sanos**

- Individuos con proceso infeccioso en curso, diagnóstico de neoplasia o enfermedad autoinmune.
- Individuos con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2.
- Individuos que rehúsen entrar al estudio y por tanto no firmen el consentimiento informado.
- Individuos con dificultades para completar la información pertinente.
- Individuos que estén recibiendo antibiótico en los últimos 3 meses.
- Individuos en embarazo o lactancia.

### **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

El proyecto describió una investigación científica en sujetos humanos que representa un riesgo mínimo para los participantes, basados en los principios éticos consignados en la Declaración de Helsinki y en la normativa colombiana consignada en la Resolución 8430 de 1993; esta investigación se rigió bajo las premisas del Capítulo I, que hace alusión a los estamentos éticos mencionados. Los participantes de la investigación dieron su consentimiento informado escrito antes de la inclusión en el estudio; la toma de muestras represento un riesgo mínimo para el participante, dado que eran exámenes rutinarios que no generan riesgo adicional y fueron tomados por personal entrenado; respecto a la cantidad de sangre extraída, se encontró dentro de los rangos de riesgos mínimos. Bajo la ley de ética médica, el estudio se rigió bajo el precepto de respeto a los participantes, protegiendo sus derechos y bienestar; y asegurando la confidencialidad de la información suministrada. Este estudio fue aprobado por el comité de ética médica del Hospital Militar Central bajo el código 2014-035, 2015-047 y 2022-085 según lo establece la norma.

### 3.3. Evaluación de índices demográficos y clínicos generales

Edad, sexo, talla, peso, índice de masa corporal (IMC).

### 3.4. Evaluación de marcadores articulares y/o Índices de actividad reumática en pacientes con ART

- **VAS "Pain Visual Analogue Scale"**: Es una escala visual análoga para medir el dolor, estimada propiamente por el paciente. Se recomienda su medición con una escala numérica horizontal de 10 cm dividida, mediante marcas verticales, en 10 segmentos iguales de 1 cm. Las mediciones se acompañarán con descriptores numéricos del 0 al 10, con indicadores en los extremos que marquen ningún dolor (0) y máximo dolor (10) (Langley & Sheppard, 1985)
- **DAS28 "Disease Activity Score 28"**: Se basa en el recuento de 28 articulaciones dolorosas (NAD28) y tumefactas (NAT28), velocidad de sedimentación globular (VSG) y evaluación global de la salud efectuada por el paciente (EGP) sobre una escala analógica visual. Se calcula mediante la fórmula matemática:  $DAS28 = 0.56 (\sqrt{NAD28}) + 0.28 (\sqrt{NAT28}) + 0.70(\ln VSG) + 0.014 (EGP)$  (Prevoo et al., 1995).
- **SDAI "Simplified Disease Activity Index"**: Se calcula mediante una suma aritmética del número de articulaciones dolorosas y tumefactas, con índices reducidos de 28 articulaciones, valoración de la actividad por el paciente y el médico (medidos de 0 a 10) y la concentración de PCR en mg/dL (Smolen et al., 2003).

### 3.5. Evaluación de marcadores articulares en familiares en primer grado de pacientes con AR y controles sanos

Evaluación de presencia de articulaciones dolorosas o inflamadas por un reumatólogo experto.

### 3.6. Métodos de laboratorio

- Obtención de muestras de sangre venosa, cumpliendo con las buenas prácticas de laboratorio.
- Medición de Proteína C Reactiva ultrasensible (PCR): (Immulate 1000, Siemens® referencia 10286287 High sensitive PCR Erlangen Germany). Técnica de quimioluminiscencia. Valores normales <3 mg/L.
- Determinación de velocidad de sedimentación globular (VSG): (Test 1 THL AliFAX® Polverara (PD)-Italy). Método de fotometría. Valor de referencia ≤20 mm/h.
- Medición de Factor Reumatoide IgM: (Beckmn Coulter 447070, Image 800® RF TEST, ref. 1107105 Spinreact, Santa Coloma, Spain). Técnica de nefelometría cinética. Resultado negativo <20 UI/mL.
- Cuantificación de anticuerpos anti citrulinado: (Quanta lite® CCP 3.1 IgG/IgA, INNOVA Diagnosis, San Diego, CA, USA y IMTEC –ITC 60015). Técnica de Inmuno-Ensayo indirecto en fase sólida (ELISA) tipo sándwich. Resultado: negativo <20 Unidades ELISA/mL.
- Cuantificación de anticuerpos carbamilados: Técnica de inmuno-ensayo indirecto en fase solida (ELISA) modificado (Shi et al, 2011) para la cuantificación en suero de IgG dirigido contra proteínas carbamiladas anti-FCS-CarP donde el antígeno fue suero fetal bovino carbamilado con cianato de potasio y péptidos sintetizados derivados de la secuencia de la cadena beta del fibrinógeno (anti-Fib, anti-Ca-Fib2 y anti-Ca-Fib3)(Chila et al., 2020).
- Tipificación de los alelos HLA-DRB1: Extracción de ADN genómico a partir de sangre periférica mediante el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Ref: A1120, Promega). Se tipifican todos los alelos HLA-DRB1 empleándose el kit comercial HLA-DRB1 (MILLIPLEX® MAP, refs: HADK1MAG61K03; IMMUCOR, LifeCode, 628923) por tecnología en fase solida Luminex xMAP®.

### 3.7. Evaluación de SNPs mediante High Resolution Melting

Se tomaron como referencia los SNPs planteados por de Rooy y colaboradores que demostraron una asociación significativa con la progresión del daño articular en AR (De Rooy et al., 2013). Posteriormente se diseñaron los primers a través del Software Bacon Designer 8.0®

Para DKK-1 se describen los polimorfismos rs1896367, rs1896368, los cuales son variantes no codificantes en la transcripción y se encuentran localizadas en el gen PRKG1-AS1 y rs1528873 que es una variante intrónica. La caracterización de estos polimorfismos se realizó en sentido 3' a 5', ya que se encuentran identificados en la región anti sentido del gen PRKG1-AS1.

**Tabla 1. Descripción de SNPs de los componentes de la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -Catenina y selección de primers a través del Software Bacon Designer 8.0®**

Polimorfismo (SNP)	Secuencia 5' a 3'	Ancestral>variante (3'-5')
(DKK) rs1896368	F: GACACCCAGTCTTAGAAA R: AGAATCCTTACACGAGTTA	C>T (G>A)
(DKK) rs1896367	F: AGTAATAATCATTGACACTGA R: TCCAGGCACTTAATACTT	C>T (G>A)
(DKK) rs1528873	F: GAGTGGTCAGGAATAAGA R: GCATTGTTAAGGCTATCA	A>C (T>G)
(SOST) rs6503475	F: GTGTAATGGTAAGTATAGC R: TTTGTAGCCAGTTGA	G>A
(KREMEN) rs132274	F: CTGACAGCAG R: CTGTATAAATAATCTCTAAAGGTGC	C>T
(LRP-5) rs3736228	F: AGGCAGACTGTCAGGACCGCT R: AGGGTCTTGGCAGAGCCTTGA	C>T

- Extracción de ADN genómico a partir sangre total anticoagulada con EDTA usando el kit DNA 2000 (Corpogen Corporation, Bogotá Colombia) y siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Amplificación y detección de los fragmentos seleccionados:

Se utilizó el kit Precision Melt Supermix (Biorad, Catalog #172-5112, Foster city, California USA) que contiene iTaq™ Polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Colorante EvaGreen, potenciadores y estabilizadores en una fórmula optimizada para

aplicación de High Resolution Melting. Se realizó amplificación mediante real time-PCR (real time polymerase chain reaction) empleando el analizador CFX96™ de BioRad y posteriormente se realizó análisis de las curvas de melting mediante el software Precision Melt Analysis Software™. (Taylor et al., 2012). A continuación, se relaciona el volumen de ensayo y el protocolo empleado en la PCR y High Resolution Melting (Tabla 2 y 3).

<b>Componente</b>	<b>Volumen para 10 µL de reacción, µL</b>
Precision Melt Super Mix	5
2 µM primer mix	1
Agua libre de ADNasa	3
Genomic DNA 50ng/mL	1

<b>Etapas del ciclo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b># de Ciclos</b>
Denaturación inicial del ADN	95 °C	2 min.	1
<b>CICLO DE PCR</b>			
Denaturación	95°C	10 seg.	45
Anillamiento/Extensión (+ lectura de la placa)	54°C (DKK-1 Y SOST) 60°C (KREMEN Y LRP-5)	30 seg.	
Extensión	72°C	30 seg.	
<b>ANÁLISIS HIGH RESOLUTION MELTING</b>			
Formación Heteroduplex	95°C	30 Seg.	1
	60°C	1 min.	1
HRM + lectura de la placa	65-95°C (En incremento 0.2°C )	10 seg/ paso	1

La identificación de polimorfismos por High Resolution Melting o análisis de alta resolución de fusión es una técnica desarrollada recientemente para el análisis post-PCR rápido y de alto rendimiento de mutaciones genéticas o varianza en las secuencias de ácidos nucleicos. Su principio se basa en el análisis de una curva de melting post PCR producida por un incremento de la temperatura cada 0.2°C, de



este modo es desnaturalizado gradualmente el ADN blanco amplificado. Emplea un colorante fluorescente que se une específicamente a la doble cadena de ADN, este, es usado para monitorear la amplificación durante la PCR y los procesos de fusión post PCR, el colorante genera un incremento en la señal fluorescente una vez unida a la doble cadena de ADN y disminuye la señal fluorescente cuando la doble cadena pasa a una sola hebra de ADN; la tasa más alta de disminución de fluorescencia es generalmente la temperatura de fusión de la muestra de ADN. La  $T_m$  se define como el punto en el cuál la doble cadena de ADN se disocia a ADN de cadena sencilla, es decir la temperatura a la que el 50% de la muestra de ADN es de cadena doble y el 50% es de cadena sencilla. El perfil de fusión depende de la longitud, contenido de GC, secuencia y heterocigosidad del ADN blanco amplificado, se obtienen gráficas basados en la temperatura de fusión las cuales agrupa resultados similares y diferencia las muestras con diferente temperatura de fusión basado en las diferentes variaciones genéticas amplificadas (Taylor et al., 2012).

La caracterización de las curvas de Melting fueron categorizadas basados en la presencia o no de las variantes genéticas, así como si se encuentra en estado homocigoto y heterocigoto, el cual se definió basado en la comparación con la secuenciación.

Se realizó confirmación del tamaño del producto por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

La confirmación de variantes polimórficas fue realizado por secuenciación de Sanger, realizado en el servicio de Secuenciación y Análisis Molecular Instituto de Genética – SsiGMol; las muestras fueron procesadas empleando la química del BigDye Terminator de ABI (el método del dideoxi o Sanger) y fueron corridas en un analizador genético Applied Biosystems 3500 con capacidad de lectura de secuencia de aproximadamente 1,000 pares de bases, la secuenciación Sanger utiliza la terminación específica con cuatro fluorocromos diferentes que permite la realización de secuenciación en una reacción.

### **3.8. Análisis estadístico**

Se realizó estadística descriptiva con medidas de tendencia central y dispersión; media, mediana, desviación estándar y rango intercuartílico para datos continuos de cada indicador clínico evaluado para el diagnóstico reumatológico. Porcentajes y frecuencias para variables categóricas. Test exacto de Fisher y  $X^2$  de Pearson fueron usados basados en la distribución de los datos y comparados los grupos entre sí. Todas las variantes génicas y/o variables compuestas que mostraron alguna relación con el diagnóstico reumatológico y/o variables clínicas reumatológicas fueron incluidas en un modelo de regresión logística multinomial para confirmar dichas relaciones. Adicionalmente fue realizado un análisis discriminante de correspondencias múltiples validado mediante la evaluación de la fiabilidad de la matriz por Alpha de Cronbach, considerándose adecuado cuando el valor del coeficiente fue  $> 0.6$ . El análisis discriminante de correspondencias múltiples (MCDA) para variables categóricas es una técnica utilizada para acentuar la variación y resaltar patrones fuertes en un conjunto de datos para que los datos sean fáciles de explorar y visualizar. El método logra agrupar variables y discriminar grupos de pacientes con características comunes bajo la validación del coeficiente de confiabilidad Alfa de Cronbach (Cáceres A, et al. 2010). Cada dimensión está representada por un coeficiente de correlación (CC) dentro del grupo, que va de  $-1,0$  a  $+1,0$ . Se consideró una contribución alta cuando los valores de CC fueron  $> 0,7$ , intermedia cuando  $0,5-0,7$  y valores entre  $0,5$  y  $0,3$  se consideraron bajos.

Todos los análisis se realizaron usando paquete estadístico IBM-SPSS V26 para Windows. Todos los análisis se hicieron con un nivel de confianza del 95%, donde todos los valores de p inferiores a 0.05 fueron considerados significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN

#### 4.1.1. Características generales, sociodemográficas y socioeconómicas de pacientes con ART y controles.

Se incluyeron 66 pacientes con diagnóstico de ART, los cuales fueron pareados por edad y sexo con el grupo control, presentaron una mediana de edad de 52 y 51 años respectivamente (RIQ: 38.75 – 56.0), el 78,8% fueron mujeres.

En la evaluación del IMC, el 40.9% de los pacientes con ART presentaron sobrepeso y el 12.1% obesidad y para el grupo control, el 31.8% de los individuos presentaron sobrepeso y el 4.5% obesidad, sin diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.096$ ).

Frente al consumo de cigarrillo los pacientes con ART, el 6.1% refirieron consumo de cigarrillo, el 34,8% tuvieron antecedentes de consumo de cigarrillo y el 18.2% fueron fumadores pasivos; para el grupo control el 10.6% de los individuos refirieron fumar, el 36.4% fumaron y el 22.7% fueron fumadores pasivos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.531$ ,  $p=1.000$ ,  $p=0.667$  respectivamente).

<b>Tabla 4. Características sociodemográficas de pacientes con artritis reumatoide temprana y controles</b>					
	<b>ART</b>		<b>Controles</b>		<b>Valor p</b>
	<b>n=66</b>	<b>%</b>	<b>n=66</b>	<b>%</b>	
<b>Sexo</b>					
Masculino	14	21.2	14	21.2	1.000
Femenino	52	78.8	52	78.8	
<b>Edad</b>	52 (38.75 – 56.0)		51 (38.5 – 56.0)		
<b>IMC</b>					
Normal	31	47.0	42	63.6	0.096
Sobrepeso	27	40.9	21	31.8	
Obesidad	8	12.1	3	4.5	
<b>Fuma</b>					
Si	4	6.1	7	10.6	0.531
No	62	93.9	59	89.4	
<b>Fumó</b>					
Si	23	34.8	24	36.4	1.000
No	43	65.2	42	63.6	
<b>Fumador pasivo</b>					
Si	12	18.2	15	22.7	0.667
No	54	81.8	51	77.3	
<b>Actividad económica</b>					
Hogar	22	33.3	13	19.7	<b>0.014*</b>
Independiente	9	13.6	2	3.0	
Empleado	26	39.4	44	66.7	
Pensionado	6	9.1	3	4.5	
Estudiante	3	4.5	4	6.1	
<b>Tipo de vivienda</b>					
Propia	45	68.2	46	69.7	0.764
Arrendada	16	24.2	15	22.7	
Común	5	7.6	4	6.1	
Alojamiento	0	0.0	1	1.5	
<b>Estado civil</b>					
Casado	36	54.5	28	42.4	0.507
Soltero	17	25.8	18	27.3	
Viudo	2	3.0	5	7.6	
Unión libre	6	9.1	10	15.2	
Separado	5	7.6	5	7.6	
<b>Nivel de estudios</b>					
Primaria	9	13.6	8	12.1	0.638
Bachillerato	20	30.3	16	24.2	
Técnico	8	12.1	13	19.7	
Universitario	29	43.9	29	43.9	

IMC: Índice de masa corporal

\* Test X<sup>2</sup> sig. p <0.05

Respecto a la actividad económica los pacientes de ART, el 39.4 % fueron empleados, con vivienda propia (68.2%), casados (54.5%) y con un nivel de estudios universitario (43.9%) y en el grupo control el 76% refirió ser empleado, con vivienda propia (68%), estado civil casados (38%) y con nivel de estudios universitario (46%), ver tabla 4.

#### **4.1.2. Características generales, sociodemográficas y socioeconómicas de familiares de primer grado de pacientes con AR temprana y controles**

El grupo de familiares incluyó 50 individuos de primer grado de consanguinidad de los pacientes diagnosticados con ART; fueron pareados por edad y sexo con el grupo control, el 82% del grupo de familiares fueron mujeres (n=41), con una mediana de edad de 41 y 41.5 años respectivamente (RIQ: 27.0 – 54.0).

Respecto al IMC, el grupo de familiares presentó 26% de sobrepeso y 6% de obesidad, mientras que en el grupo control el 16% presentó sobrepeso y el 4% obesidad, sin diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.391$ ), ver tabla 5.

En el grupo de familiares el 4% refirió consumo de cigarrillo, el 28% refirió antecedente de consumo de cigarrillo y el 12% ser fumador pasivo. Del grupo control el 10% refirió fumar, el 30% fumó y el 18% fueron fumadores pasivos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.436$ ,  $p=1.000$ ,  $p=0.577$  respectivamente.)

En el grupo de familiares respecto a la actividad económica el 54% eran empleados, con vivienda propia (62%), solteros (54%) y con un nivel de estudios universitario (72%) y para el grupo control el 76% refirió ser empleado, con vivienda propia (68%), estado civil casados (38%) y con nivel de estudios universitario (46%) ver tabla 5.

**Tabla 5. Características sociodemográficas de familiares de primer grado de pacientes con artritis reumatoide temprana y controles**

	Familiares 1°		Controles		Valor p
	n=50	%	n=50	%	
<b>Sexo</b>					
Masculino	9	18	10	20	1.000
Femenino	41	82	40	80	
<b>Edad</b>	41.5 (27.0 – 54.0)		41 (27.0 – 53.2)		
<b>IMC</b>					
Normal	34	68	40	80	0.391
Sobrepeso	13	26	8	16	
Obesidad	3	6	2	4	
<b>Fuma</b>					
Si	2	4	5	10	0.436
No	48	96	45	90	
<b>Fumó</b>					
Si	14	28	15	30	1.000
No	36	72	35	70	
<b>Fumador pasivo</b>					
Si	6	12	9	18	0.577
No	44	88	41	82	
<b>Actividad económica</b>					
Hogar	7	14	8	16	<b>0.008*</b>
Independiente	9	18	0	0	
Empleado	27	54	38	76	
Pensionado	3	6	0	0	
Estudiante	4	8	4	8	
<b>Tipo de vivienda</b>					
Propia	31	62	34	68	0.901
Arrendada	12	24	11	22	
Común	6	12	4	8	
Alojamiento	1	2	1	2	
<b>Estado civil</b>					
Casado	14	28	19	38	0.158
Soltero	27	54	15	30	
Viudo	2	4	2	4	
Unión libre	4	8	9	18	
Separado	3	6	5	10	
<b>Nivel de estudios</b>					
Primaria	1	2	5	10	<b>0.032*</b>
Bachillerato	7	14	8	16	
Técnico	6	12	14	28	
Universitario	36	72	23	46	

IMC: Índice de masa corporal

\* Test X<sup>2</sup> de Pearson sig. p <0.05

#### **4.1.3. Evaluación de la actividad reumática de los pacientes con AR temprana**

La evaluación de la actividad reumática de los pacientes con ART incluyó los marcadores serológicos y variables de actividad clínica, para los cuales, en el grupo de ART se encontraron mayores niveles de PCR que en los individuos control ( $p=0.002$ ), mientras que los valores de VSG no mostraron diferencias estadísticamente significativas. (Tabla 6).

Por su parte, la evaluación de articulaciones dolorosas, evidencio que el 75,8% de pacientes con ART presentaban al menos una articulación dolorosa, frente a un 24,2% de la población control ( $p=0.001$ ), y la presencia de al menos una articulación inflamada se encontró en el 69,7% de los pacientes con ART frente al 10,6% en los individuos control ( $p=0.001$ ).

La actividad clínica en los pacientes con ART según el índice DAS28-VSG se encontró que, el 66.7% presentó actividad severa, así como por el índice de SDAI, que representó el 62.1%; el 34.8% refirió máxima incapacidad con un puntaje  $>3$  en el cuestionario HAQ (Tabla 6).

#### **4.1.4. Evaluación del perfil de auto anticuerpos de los pacientes con AR temprana**

Los pacientes de ART mostraron niveles significativamente altos de auto anticuerpos respecto al grupo control; para factor reumatoide el 30.3% de los pacientes presentaron valores positivos y el 25.8% valores positivos altos ( $p=0.001$ ), el 25.8% tuvieron anticuerpos anti-CCP significativamente altos frente al grupo control ( $p=0.001$ ) y los anticuerpos anti carbamilados se encontraron mayores a 20 unidades en el 45.6% frente a un 13.8% en controles ( $p=0.001$ ). Ver tabla 7.

**Tabla 6. Actividad reumática de los pacientes con artritis reumatoide temprana y controles**

	ART		Controles		Valor p
	n=66	%	n=66	%	
<b>VSG (mm)</b>	11.5 (7.7 – 29.2)		7 (3.0 – 20.2)		0.570
≤ 20 mm	44	66.7	48	72.7	
> 20 mm	22	33.3	18	27.3	
<b>PCR (mg/L)</b>	4.2 (1.6 – 11.6)		1.92 (0.68 – 3.88)		<b>0.002*</b>
Negativo	26	39.4	40	60.6	
Positivo	20	30.3	21	31.8	
Positivo alto	20	30.3	5	7.6	
<b>Articulaciones dolorosas</b>					<b>0.001*</b>
Ninguna	16	24.2	50	75.8	
>1	50	75.8	16	24.2	
<b>Articulaciones inflamadas</b>					<b>0.001*</b>
Ninguna	20	30.3	59	89.4	
>1	46	69.7	7	10.6	
<b>DAS28-VSG</b>					
≤ 2.6	16	24.2	-	-	
2.6 – 3.2	6	9.1	-	-	
> 3.2	44	66.7	-	-	
<b>VAS</b>					
≤ 50	46	69.7	-	-	
> 50	20	30.3	-	-	
<b>HAQ</b>					
0	27	40.9	-	-	
1	9	13.6	-	-	
2	6	9.1	-	-	
3	23	34.8	-	-	
4	1	1.5	-	-	
<b>SDAI</b>					
≤ 3.3	8	12.1	-	-	
3.3 - 11	17	25.8	-	-	
> 11	41	62.1	-	-	
<b>RAPID</b>					
0	0	0.0	-	-	
1	31	47.0	-	-	
2	17	25.8	-	-	
3	7	10.6	-	-	
4	11	16.7	-	-	

VSG: Velocidad de sedimentación globular, PCR: Proteína C reactiva, DAS28-VSG: Índice de actividad de la enfermedad y VSG, VAS: Escala analógica visual, HAQ: Cuestionario de capacidad funcional, SDAI: Índice simplificado de actividad de la enfermedad, RAPID: Cuestionario de evaluación del estado de salud.

\* Test X<sup>2</sup> de Pearson, Prueba exacta de Fisher, sig. p <0.05



<b>Tabla 7. Perfil de auto anticuerpos de los pacientes con artritis reumatoide temprana y controles</b>					
	<b>ART</b>		<b>Controles</b>		<b>Valor p</b>
	<b>n=66</b>	<b>%</b>	<b>n=66</b>	<b>%</b>	
<b>FR (mg/dL)</b>	30.3 (1.15 – 74.0)		10(10.0 – 10.0)		<b>0.001*</b>
Negativo	29	43.9	62	93.9	
Positivo	20	30.3	3	4.5	
Positivo alto	17	25.8	1	1.5	
<b>Anti CCP (Unidades)</b>	7.8 (7.8 – 104.9)		7.8 (7.8 – 7.8)		<b>0.001*</b>
<20	37	56.1	61	92.4	
20 – 39	12	18.2	4	6.1	
40 – 59	17	25.8	1	1.5	
<b>Anti CarP (Unidades)</b>	16.7 (12.3 – 31.7)		11.5 (7.4 – 17.0)		<b>0.001*</b>
<20	31	54.4	56	75.8	
>20	26	45.6	9	24.2	

FR: Factor reumatoide, Anti CCP: Anticuerpos anti péptido citrulinado, Anti CarP: Anticuerpos anti proteínas carbamiladas.

\* Test X<sup>2</sup> de Pearson, Prueba exacta de Fisher, sig. p <0.05

#### **4.1.5. Evaluación de marcadores inflamatorios y clínicos articulares de los familiares en primer grado de pacientes con AR temprana**

El grupo de familiares no mostro diferencias estadísticamente significativas en marcadores de inflamación, el 14% de familiares y el 18% del grupo control mostraron altos niveles de VSG, y los niveles de PCR fueron altos en el 12% en familiares y 6% en controles (p=0.786, p=0.528 respectivamente).

A pesar de ser individuos sanos, pero genéticamente ligados con pacientes con ART se evaluó en ellos la presencia de articulaciones dolorosas evidenciándose una tendencia a la significancia, donde el 44% de familiares presentaba al menos una articulación dolorosa, frente a un 24% en la población control (p=0.057), mientras que en la evaluación de articulaciones inflamadas no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p=0.760). Ver tabla 8.

**Tabla 8. Evaluación de marcadores inflamatorios y clínicos articulares de los familiares en primer grado de pacientes con AR temprana y controles**

	Familiares 1°		Controles		Valor p
	n=50	%	n=50	%	
<b>VSG (mm)</b>	7 (4 – 15)		5 (2 – 14)		0.786
≤ 20 mm	44	86	41	82	
> 20 mm	7	14	9	18	
<b>PCR (mg/L)</b>	2.01 (1.04 – 5.15)		1.46 (0.50 – 4.43)		0.528
Negativo	32	64	36	72	
Positivo	12	24	11	22	
Positivo alto	6	12	3	6	
<b>Articulaciones Dolorosas</b>					0.057
Ninguna	28	56	38	76	
>1	22	44	12	24	
<b>Articulaciones inflamadas</b>					0.760
Ninguna	43	86	45	90	
>1	7	14	5	10	

VSG: Velocidad de sedimentación globular, PCR: Proteína C reactiva.  
 \* Test X<sup>2</sup> de Pearson sig. p <0.05

#### 4.1.6. Evaluación del perfil de auto anticuerpos asociados a compromiso articular en los familiares en primer grado de pacientes con AR temprana

Los niveles de factor reumatoide y anti-CCP, no mostraron significancia entre familiares y grupo control, se presentaron bajos niveles de factor reumatoide en ambos grupos (2%), los niveles de anti-CCP se encontraron altos en el 18% de los familiares frente a un 8% en controles (p=0.234) y los anticuerpos anti carbamidados tuvieron una tendencia estadística importante (p=0.059), encontrándose niveles mayores a 20 unidades en el 34% de los familiares frente a un 16% en controles. Ver tabla 9.

**Tabla 9. Perfil de auto anticuerpos de los familiares en primer grado de pacientes con artritis reumatoide temprana y controles**

	Familiares 1°		Controles		Valor p
	n=50	%	n=50	%	
<b>FR (mg/dL)</b>	9.01 (0.0 – 10.0)		10(10.0 – 10.0)		0.900
Negativo	46	92	47	94	
Positivo	3	6	2	4	
Positivo alto	1	2	1	2	
<b>Anti CCP (Unidades)</b>	7.81 (7.81 – 7.81)		7.81 (7.81 – 7.81)		0.234
0	41	82	46	92	
1	9	18	4	8	
<b>Anti CarP (Unidades)</b>	17.16 (13.7 – 25.05)		11.0 (8.07 – 16.8)		0.059
<20	31	66	42	84	
>20	16	34	8	16	

FR: Factor reumatoide, Anti CCP: Anticuerpos anti péptido citrulinado, Anti CarP: Anticuerpos anti proteínas carbamiladas.

\* Test X<sup>2</sup> de Pearson, Prueba exacta de Fisher, sig. p <0.05

## 4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE LA VÍA WNT/ $\beta$ CATENINA: DKK-1, SOST, KREMEN, LRP-5

### 4.2.1. Localización genómica de las variantes de los genes DKK-1, SOST, KREMEN y LRP-5.

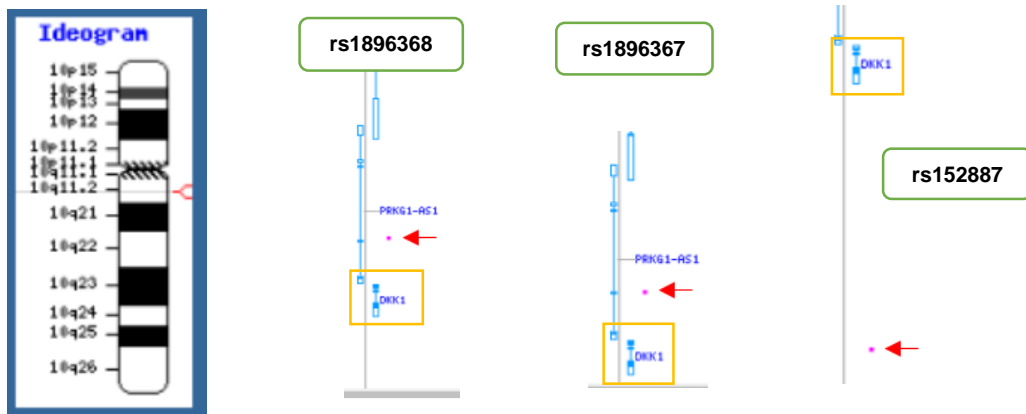
Para la determinación de los polimorfismos de los componentes de la vía de señalización Wnt/  $\beta$ -Catenina: Dickkopf-1 (DKK-1), Esclerostina (SOST), KREMEN y LRP-5, se tomó como referencia los SNPs planteados por de Rooy y cols., que demostraron una asociación significativa con la progresión del daño articular en AR (De Rooy et al., 2013).

Se obtuvo la información general de las variantes mediante la revisión de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y se realizaron alineamientos para determinar la localización genómica de las variantes, mediante la herramienta bioinformática BLAST. (Altschul et al.; 1990).

Para DKK-1 se describen los polimorfismos rs1896367, rs1896368, los cuales son variantes no codificantes en la transcripción y se encuentran localizadas en el gen PRKG1-AS1 y rs1528873 es una variante intrónica. Estos polimorfismos se encuentran localizados en sentido 3' a 5', en antisentido, por tanto fueron caracterizados teniendo en cuenta esta localización para su posterior análisis.

La variante rs1896367 se encuentra ubicada en el cromosoma 10:52309426, a 4984 pb al lado 3' del precursor de DKK1, el nucleótido ancestral es C y en sentido 3'-5' es G, su variante es T, en sentido 3'-5' es A; la variante rs1896368 se encuentra

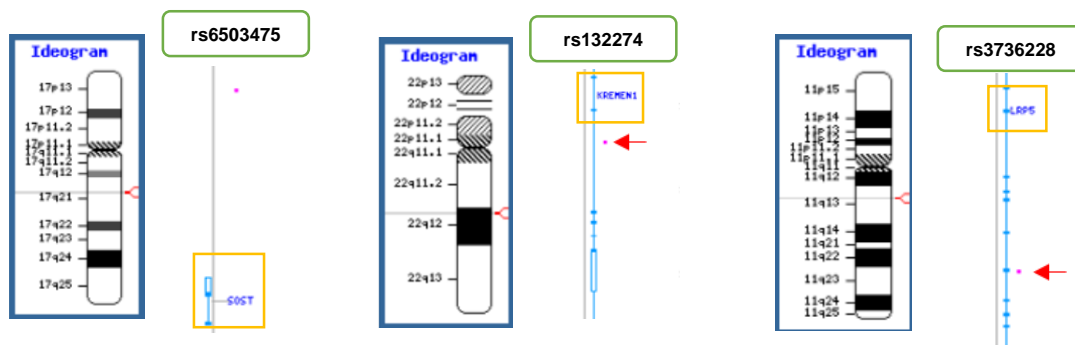
localizada en el cromosoma 10:52309144 a 5266 pb al lado 3' del precursor de DKK1, su nucleótido ancestral es C (G en sentido 3'-5') y su variante es T (A en sentido 3'-5') y la variante rs1528873 se encuentra localizada en el cromosoma 10:52342245 a 25413 pb al lado 5' del precursor de DKK, su nucleótido ancestral es A (T en sentido 3'-5') y su variante es C (G en sentido 3'-5'). (Figura 2).



**Figura 2. Localización genómica de los SNPs de DKK-1 rs1896368, rs1896367 y rs1528873.**

Tomado de: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

Para el gen SOST se analizó la variante intrónica rs6503475 que se encuentra ubicada en el cromosoma 17:43733640, a 21677 pb al lado 3' del precursor de Esclerostina, el nucleótido ancestral es G y su variante es A. Respecto al gen de KREMEN se analizó la variante rs132274, la cual se encuentra ubicada en el cromosoma 22:29129138, asociado a la isoforma 2 y 3 del precursor de la proteína KREMEN, el nucleótido ancestral es C y su variante es T, corresponde a una variante intrónica. Por su parte para el gen de LRP-5 se describió la variante rs3736228 que se encuentra ubicada en el cromosoma 11:68433827, el nucleótido ancestral es C y su variante es T, esta variante se encuentra localizada en el exón del gen, a nivel proteico genera cambio de alanina por una valina en la posición 1330. (Figura 3).



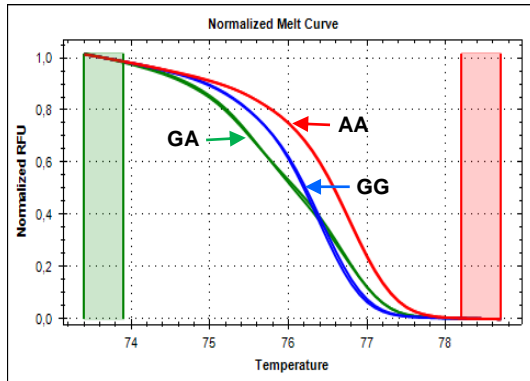
**Figura 3. Localización genómica de los SNPs de SOST rs6503475, KREMEN rs132274 y LRP-5 rs3736228.**

Tomado de: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

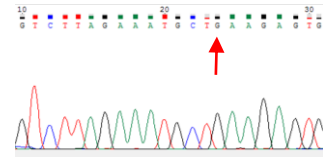
#### **4.2.2. Caracterización de las variantes de los genes DKK-1, SOST, KREMEN-1 y LRP-5 por High Resolution Melting, secuenciación de Sanger y electroforesis.**

La caracterización de las variantes se obtuvo mediante el análisis post PCR de la temperatura de fusión o  $T_m$  (Temperatura de melting) y el cambio de la forma de la curva de disociación empleando el análisis de High Resolution Melting (HRM) o curvas de disociación de alta resolución; se llevó a cabo la normalización de los datos, estableciéndose valores equivalentes de fluorescencia inicial a también denominada “pre-melt”, así como la fluorescencia final o “post-melt” de todas las muestras analizadas, se obtuvo una curva de variación de la temperatura, donde se estableció el punto en el cual el ADN, se encuentra totalmente desnaturalizado y finalmente se genera una curva de referencia que muestra las diferencias en la forma de las curvas de disociación, correspondientes a las variantes polimórficas. La técnica de HRM permite detectar la variación de las secuencias, sin embargo, no se puede determinar cuál es el cambio en la base que está presente en los alelos, por lo anterior, se empleó la secuenciación de Sanger para la confirmación y asignación del genotipo correspondiente a cada variante polimórfica (Figura 4 a 9). Así mismo, los tamaños de los productos de amplificación fueron confirmados a través de electroforesis en gel de agarosa al 2% (Figura 10).

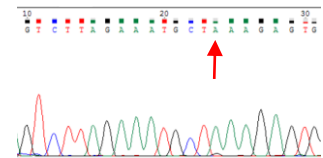
A.



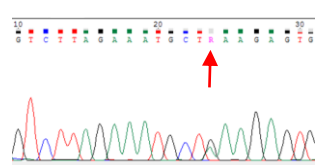
B.



C.

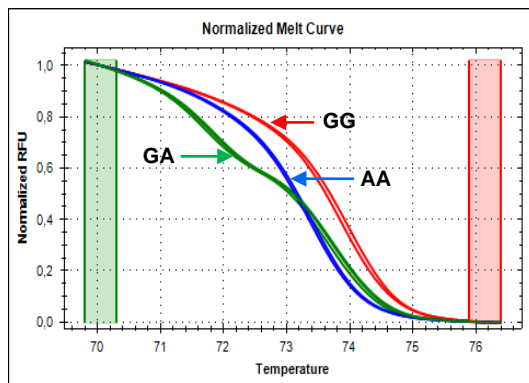


D.

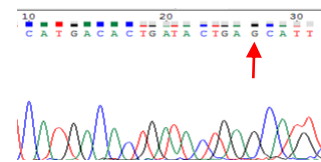


**Figura 4. Variante DKK-1 rs1896368.** A. Curvas de Melt normalizadas obtenidas mediante PCR-HRM. B,C,D. Fragmentos del cromatograma de la secuenciación de Sanger en sentido 3' a 5' que muestra la presencia de la secuencia nativa G/G (B), variante homocigota A/A (C), variante heterocigota G/A (D).

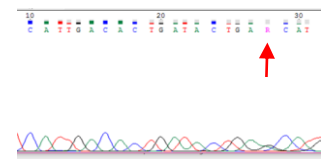
A.



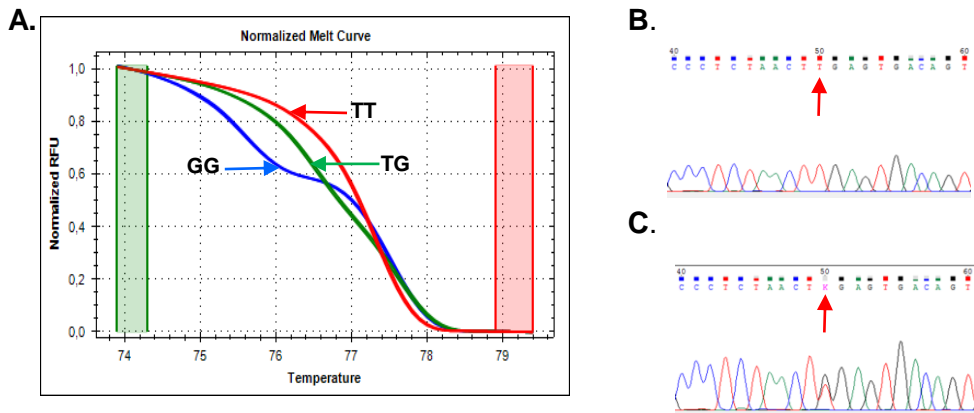
B.



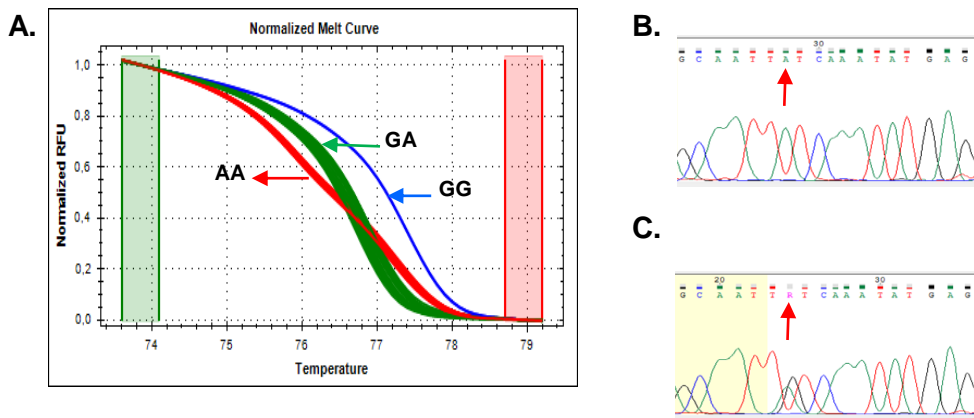
C.



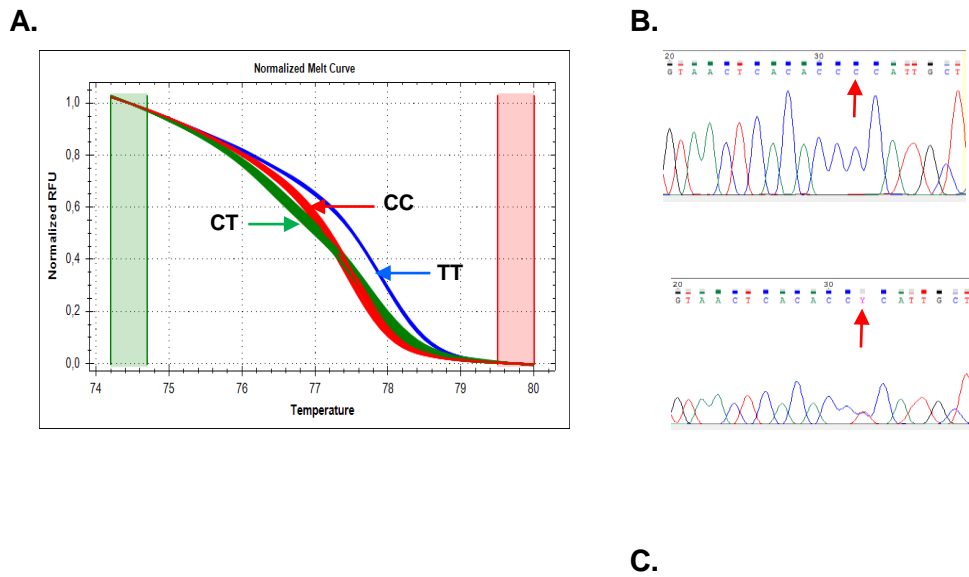
**Figura 5. Variante DKK-1 rs1896367.** A. Curvas de Melt normalizadas obtenidas mediante PCR-HRM. B,C. Fragmentos del cromatograma de la secuenciación de Sanger en sentido 3' a 5' que muestra la presencia de la secuencia nativa G/G (B), variante heterocigota G/A (C).



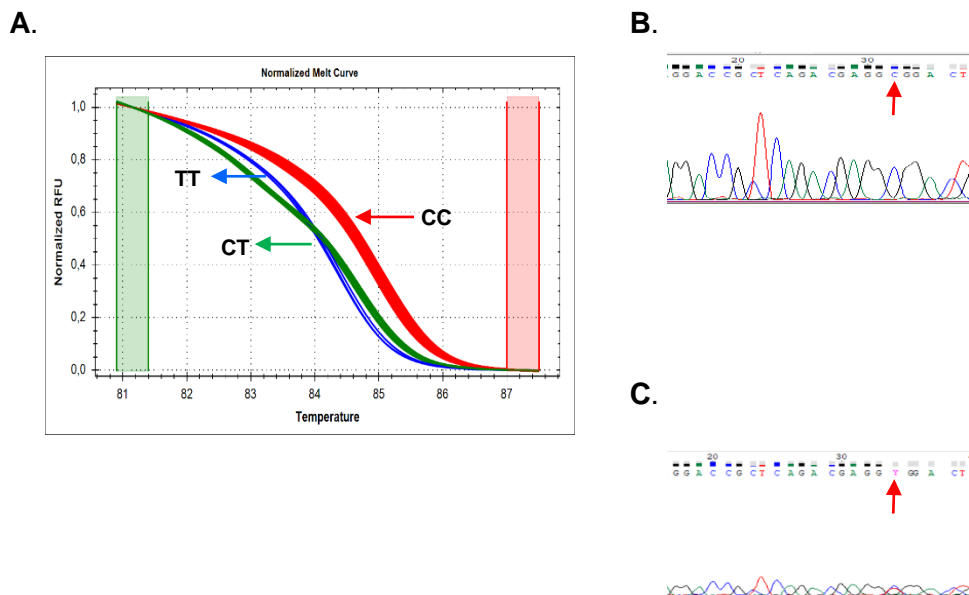
**Figura 6. Variante DKK-1 rs1528873.** A. Curvas de Melt normalizadas obtenidas mediante PCR-HRM. B,C,D. Fragmentos del cromatograma de la secuenciación de Sanger en sentido 3' a 5' que muestra la presencia de la secuencia nativa T/T (B), variante heterocigota T/G (C).



**Figura 7. Variante SOST rs6503475.** A. Curvas de Melt normalizadas obtenidas mediante PCR-HRM. B,C,D. Fragmentos del cromatograma de la secuenciación de Sanger en sentido 5' a 3' que muestra la presencia de la variante homocigota A/A (B), variante heterocigota G/A (C).

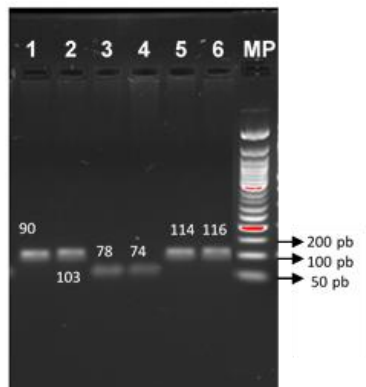


**Figura 8. Variante KREMEN rs132274.** A. Curvas de Melt normalizadas obtenidas mediante PCR-HRM. B,C. Fragmentos del cromatograma de la secuenciación de Sanger en sentido 5´ a 3´ que muestra la presencia de la secuencia nativa C/C (B), variante heterocigota C/T (C).



**Figura 9. Variante LRP-5 rs3736228** A. Curvas de Melt normalizadas obtenidas mediante PCR-HRM. B,C. Fragmentos del cromatograma de la secuenciación de Sanger en sentido 5´ a 3´ que muestra la presencia de la secuencia nativa C/C (B), variante heterocigota C/T (C).





**Figura 10. Análisis de electroforesis en gel de agarosa al 2% de los amplicones obtenidos por PCR.** KREMEN rs132274 (Carril 1), SOST rs6503475 (Carril 2), LRP-5 rs3736228 (Carril 3), DKK-1 rs1896367 (Carril 4), rs1896368 (Carril 5), rs1528873 (Carril 6).

### **4.3. FRECUENCIA GENOTÍPICA Y ALÉLICA DE POLIMORFISMOS DE LOS GENES DKK-1, SOST, KREMEN Y LRP-5.**

#### **4.3.1. Frecuencia genotípica en pacientes con AR temprana e individuos sanos.**

Se estableció la frecuencia genotípica para las variantes de los genes de los componentes de la vía de señalización Wnt/  $\beta$ -Catenina (Tabla 10); para la variante de DKK-1 rs1528873 se observó que la variante G en estado homocigoto se encuentra principalmente en los pacientes con ART y el estado heterocigoto en la población control ( $p=0.001$ ). No se encontraron diferencias significativas en las demás variantes.

**Tabla 10. Frecuencias genotípicas de los componentes de la vía de señalización Wnt/  $\beta$ -Catenina en pacientes con artritis reumatoide temprana y controles sanos**

Gen (dbSNP)	Genotipo	ART		Controles		Valor p
		n	%	n	%	
DKK-1 rs1896367	GG	39	59.1	35	53	0.775
	AA	4	6.1	5	7.6	
	GA	23	34.8	26	39.4	
DKK-1 rs1896368	GG	7	10.6	9	13.6	0.649
	AA	30	45.5	33	50.0	
	GA	29	43.9	24	36.4	
DKK-1 rs1528873	TT	41	62.1	32	48.5	<b>0.001*</b>
	GG	24	36.4	4	6.1	
	TG	1	1.5	30	45.5	
SOST rs6503475	GG	15	22.7	19	28.8	0.569
	AA	13	19.7	15	22.7	
	GA	38	57.6	32	48.5	
KREMEN rs132274	CC	4	6.1	8	12.1	0.480
	TT	35	53.0	33	50.0	
	CT	27	40.9	25	37.9	
LRP-5 rs3736228	CC	43	65.2	53	80.3	0.133
	TT	3	4.5	1	1.5	
	CT	20	30.3	12	18.2	

\* Test X<sup>2</sup> de Pearson sig. p <0.05

#### 4.3.2. Frecuencia genotípica en familiares de primer grado de pacientes con ART e individuos sanos.

La frecuencia genotípica encontrada en familiares de primer grado frente a controles sanos, evidencio que para el SNP KREMEN rs132274, el genotipo nativo se encuentra en mayor frecuencia en familiares (44%) frente a controles (12%) mientras que tener la variante en estado homocigoto se encuentra principalmente en individuos sanos presentándose en el 42% respecto a un 12% en el grupo de familiares (p=0.001); así mismo se evidencio diferencia estadísticamente significativa para el SNP LRP-5 rs3736228, encontrándose el estado nativo en el 82% del grupo control, y para el grupo de familiares, la variante homocigota en el 20% (p=0.048). Para los demás genotipos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Ver tabla 11.

**Tabla 11. Frecuencias genotípicas de los componentes de la vía de señalización Wnt/  $\beta$ -Catenina en familiares en primer grado y controles sanos**

Gen (dbSNP)	Genotipo	Familiares 1°		Controles		Valor p
		n	%	N	%	
DKK-1 rs1896367	GG	25	50	24	48	0.881
	AA	4	8	3	6	
	GA	21	42	23	46	
DKK-1 rs1896368	GG	5	10	9	18	0.471
	AA	21	42	21	42	
	GA	24	48	20	40	
DKK-1 rs1528873	TT	26	52	25	50	0.430
	GG	5	10	2	4	
	TG	19	38	23	46	
SOST rs6503475	GG	15	30	12	24	0.472
	AA	9	18	14	28	
	GA	26	52	24	48	
KREMEN rs132274	CC	22	44	6	12	<b>0.001*</b>
	TT	6	12	21	42	
	CT	22	44	23	46	
LRP-5 rs3736228	CC	34	68	41	82	<b>0.048*</b>
	TT	10	20	2	4	
	CT	6	12	7	14	

\* Test  $X^2$  sig. p <0.05

#### 4.3.3. Frecuencia alélica en pacientes con AR temprana, familiares de primer grado e individuos sanos.

Se determinó las frecuencias alélicas y se calculó el test de equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para cada grupo (Tabla 12).

Las frecuencias alélicas de los pacientes con ART y sus controles no presentaron diferencias estadísticamente significativas. En la evaluación del EHW, en el grupo de ART el SNP DKK-1 rs1896368 (EHW:  $p=4.50 \times 10^{-6}$ ) y en el grupo control el SNP DKK-1 rs1896367 (EHW:  $p=0.003$ ), se encontraron desviados del EHW, la cual podría estar explicada por un tamaño de muestra no representativo.

En el grupo de familiares se encontraron desviados del EHW el SNP DKK-1 rs1896367 ( $p=0.019$ ) en familiares, y KREMEN tanto en familiares como controles (EHW:  $p=0.019$ ,  $p=0.006$  respectivamente). Las frecuencias alélicas obtenidas en familiares de primer grado e individuos sanos, mostraron diferencias estadísticamente significativas, presentándose el alelo nativo de KREMEN en mayor frecuencia en familiares y una mayor frecuencia del alelo variante en controles ( $p=0.001$ ); así mismo, el alelo variante de LRP-5 rs3736228 se presentó en mayor frecuencia en familiares que en los individuos control ( $p=0.010$ ). (Tabla 12).

Tabla 12. Frecuencias alélicas de variantes de los componentes de los genes DKK-1, SOST, KREMEN y LRP-5 en pacientes con artritis reumatoide temprana, familiares en primer grado y controles sanos

Gen	dbSNP	ART	EHW	Controles	EHW	Valor p	Familiares 1°	EHW	Controles	EHW	Valor p	
DKK-1	rs1896367	G(C) <i>Nativo</i>	0.765	0.061	0.727	<b>0.003●</b>	0.572	0.710	<b>0.019●</b>	0.710	0.685	1.000
		A(T) <i>Variante</i>	0.235		0.273			0.290		0.290		
	rs1896368	G(C) <i>Nativo</i>	0.326	<b>4.50 e<sup>-6</sup>●</b>	0.318	1.730	1.000	0.340	0.241	0.380	1.141	0.659
		A(T) <i>Variante</i>	0.674		0.682			0.660		0.620		
	rs1528873	T(A) <i>Nativo</i>	0.629	61.7	0.712	0.779	0.190	0.710	0.298	0.730	1.393	0.875
		G(C) <i>Variante</i>	0.371		0.288			0.290		0.270		
SOST	rs6503475	G <i>Nativo</i>	0.515	1.53	0.530	<b>0.047●</b>	0.902	0.560	0.152	0.480	0.073	0.322
		A <i>Variante</i>	0.485		0.470			0.440		0.520		
KREMEN	rs132274	C <i>Nativo</i>	0.265	0.163	0.311	0.881	0.497	<b>0.660</b>	<b>0.019●</b>	<b>0.350</b>	<b>0.006●</b>	<b>0.001*</b>
		T <i>Variante</i>	0.735		0.689			<b>0.340</b>		<b>0.650</b>		
LRP-5	rs3736228	C <i>Nativo</i>	0.803	0.116	0.894	0.112	0.058	0.740	23.6	0.890	4.060	<b>0.010*</b>
		T <i>Variante</i>	0.197		0.106			<b>0.260</b>		<b>0.110</b>		

\* Test X<sup>2</sup> sig. p <0.05

● Test de Equilibrio de Hardy & Weinberg EHW (X<sup>2</sup>). sig. p <0.05

#### **4.4. ASOCIACIONES EN DE LOS ÍNDICES DE ACTIVIDAD REUMÁTICA EN PACIENTES CON AR TEMPRANA Y LA PRESENCIA DE POLIMORFISMOS DE LOS GENES DKK-1, SOST, KREMEN Y LRP-5.**

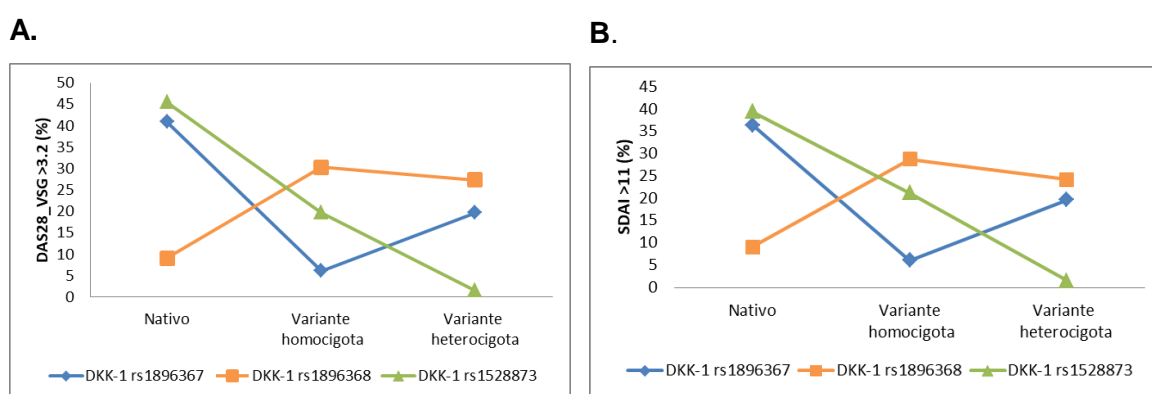
En el grupo de ART se determinó la frecuencia de genotipo para cada polimorfismo y su asociación con sexo, IMC, marcadores serológicos y variables clínicas de actividad de la enfermedad, encontrándose que las mujeres presentaban en mayor frecuencia para DKK-1 rs1896367 en estado nativo (42.4%), rs1896368 variante GA (37.9%), rs1528873 nativo TT (51.5%); para SOST rs6503475 variante GA (47.0%), para KREMEN rs132274 variante TT (43.9%) y LRP-5 rs3736228 nativo (53.0%), sin embargo, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con el sexo.

Por su parte, la evaluación del IMC no tuvo asociación con ningún genotipo, sin embargo, para DKK-1 rs1896368 tuvo tendencia a ser significativo ( $p=0.055$ ) y se encontró diferencias en el análisis bivariado con los individuos que tienen al menos 4 SNPs ( $p=0.004$ ), sin embargo, esta significancia no se mantuvo en el modelo de regresión.

Respecto a los marcadores serológicos y variables clínicas en el grupo de ART, para el SNP de DKK-1 rs1896367, el genotipo nativo GG presentó niveles  $>20$ mm de VSG (19.7%), niveles positivos altos de PCR (24.2%), presencia de al menos una articulación dolorosa (45.5%), de al menos una articulación inflamada (40.9%), una actividad de la enfermedad alta con una puntuación de DAS28\_VSG  $>3.2$  (40.9%) y un SDAI  $>11$  (36.4%), sin asociaciones estadísticamente significativas, sin embargo, el estado nativo GG se encuentra en mayor frecuencia de los pacientes de ART.

Para el SNP de DKK-1 rs1896368, las variantes en estado homocigoto AA y heterocigoto GA, mostraron niveles de PCR positivos y positivos altos (19.7%), así mismo, la presencia de articulaciones dolorosas (34.8% y 31.8% respectivamente) y de articulaciones inflamadas (31.8% y 28.8% respectivamente); mayor actividad de la enfermedad presente en el 30.3% para AA y 27.3% para GA según la puntuación obtenida de DAS28\_VSG y SDAI 28.8% y 24.2% respectivamente. Por lo anterior se evidencia mayor frecuencia de marcadores serológicos y de actividad, con la presencia de variantes polimórficas para el SNP de DKK-1 rs1896368 en estado homocigoto o heterocigoto de pacientes con ART; sin embargo, no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas.

Los pacientes con ART que presentaban el SNP de DKK-1 rs1528873 en estado nativo TT, presentaron bajos niveles de VSG y PCR (43.9%, 25.8% respectivamente); contrariamente, presentaron mayor frecuencia de articulaciones dolorosas e inflamadas (48.5%, 43.9% respectivamente) y mayor actividad de la enfermedad según DAS28\_VSG y SDAI (45.5%, 39.4%). Aunque no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas, el estado nativo se encuentra en mayor frecuencia en pacientes con ART y representa mayor frecuencia en actividad de la enfermedad alta. Ver Figura 11.



**Figura 11. A. Comparación de la actividad de la enfermedad medida por DAS28\_VSG >3.2 y SDAI >11 con los genotipos de cada polimorfismo de DKK-1 en pacientes con ART. A.** Actividad de la enfermedad alta según DAS28\_VSG>3.2. Un ligero aumento en la actividad de la enfermedad fue observado en el genotipo nativo de los polimorfismos de DKK-1 (rs1896367 GG p=0.516, rs1528873 TT p=0.563) y en el genotipo con la variante homocigota (rs1896368 AA p=0.806), sin asociaciones estadísticamente significativas. **B.** Actividad de la enfermedad alta según SDAI >11. Un ligero aumento en la actividad de la enfermedad fue observado en el genotipo nativo de los polimorfismos de DKK-1 (rs1896367 GG p=0.511, rs1528873 TT p=0.496) y en el genotipo con la variante homocigota (rs1896368 AA p=0.636), sin embargo, no fueron estadísticamente significativos

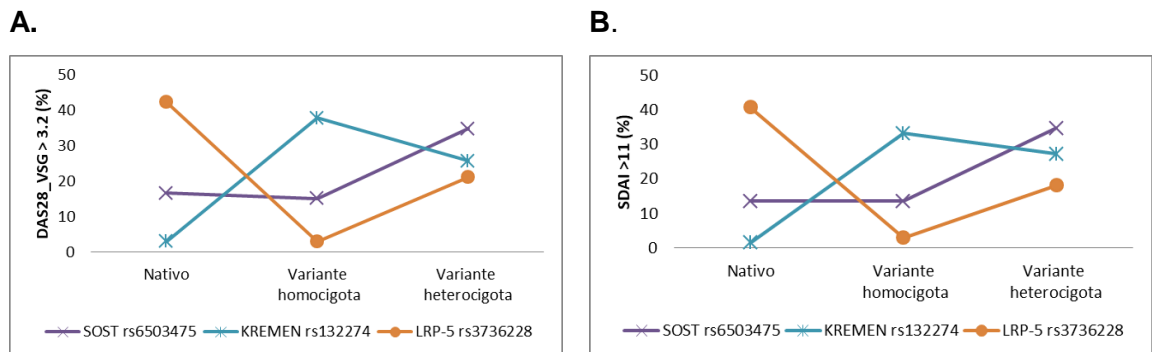
DAS28, Score 28 de la actividad de la enfermedad, VSG velocidad de sedimentación globular, SDAI Índice simplificado de la actividad de la enfermedad, ART Artritis reumatoide temprana.

Test  $\chi^2$  – Prueba exacta de Fisher sig.  $p < 0.05$

Respecto al SNP de SOST rs6503475 se encontró diferencia estadísticamente significativa con los niveles de PCR ( $p=0.049$ ) en el análisis bivariado, sin embargo, no se mantuvo en el modelo de regresión; el estado heterocigoto GA, presentó mayor frecuencia de articulaciones dolorosas e inflamadas (40.9% y 39.4% respectivamente), igualmente, mayor actividad de la enfermedad: DAS28\_VSG >3.2 Y SDAI >11, presentándose en el 34.8% de los individuos, sin embargo, no se encontraron asociados estadísticamente.

Para el SNP KREMEN rs132274, no se encontraron asociaciones con los marcadores serológicos ni con la actividad de la enfermedad, sin embargo, los individuos con la variante homocigota TT presentaron mayor frecuencia de articulaciones dolorosas e inflamadas correspondientes al 39.4%, mayor actividad de la enfermedad SDAS28\_VSG (37.9%) y SDAI (33.3%); también el estado heterocigoto CT presentó mayor frecuencia de articulaciones dolorosas e inflamadas, actividad de la enfermedad respecto al estado nativo.

Por último, para LRP-5 rs3736228, se encontró una tendencia a la significancia en con niveles de PCR ( $p=0.079$ ), así mismo, el estado nativo CC presentó mayor frecuencia de articulaciones dolorosas (48.5%) e inflamadas (45.5%), mayor actividad de la enfermedad (DAS28\_VSG 42.4% y SDAI 40.9%). Ver Figura 12.



**Figura 12. A. Comparación de la actividad de la enfermedad medida por DAS28\_VSG >3.2 y SDAI >11 con los genotipos de cada polimorfismo en pacientes con ART. A.** Actividad de la enfermedad alta según DAS28\_VSG>3.2. Un ligero aumento en la actividad de la enfermedad fue observado en el genotipo con la variante en estado heterocigoto de los polimorfismos de SOST rs6503475 GG ( $p=0.537$ ), en el genotipo con la variante homocigota de KREMEN rs132274 TT ( $p=0.695$ ) y en el genotipo nativo de LRP-5 rs3736228 CT ( $p=0.504$ ), sin embargo, no fueron estadísticamente significativos. **B.** Actividad de la enfermedad alta según SDAI >11. Se observó el mismo comportamiento descrito anteriormente, resultados sin diferencia estadísticamente significativas ( $p=0.821$ ,  $p=0.228$ ,  $p=0.935$  respectivamente). DAS28, Score 28 de la actividad de la enfermedad, VSG velocidad de sedimentación globular, SDAI Índice simplificado de la actividad de la enfermedad, ART Artritis reumatoide temprana.

Test  $\chi^2$  – Prueba exacta de Fisher sig.  $p < 0.05$



Se plantearon 4 haplotipos con base a su frecuencia genotípica en pacientes con ART y controles:

- Haplotipo 1: Variantes DKK-1 rs1896367 + rs1528873, el cual no tuvo asociación con ningún marcador serológico ni de actividad de la enfermedad, adicional, se encontró que el 62.1% de individuos que NO tienen este haplotipo presentaron >1 articulación dolorosa, así como el 59.1% presentaron >1 articulación inflamada.
- Haplotipo 2: DKK-1 rs1896368 GA + SOST rs6503475 GA + LRP-5 rs3736228 CT, el cual tuvo tendencia a la significancia ( $p=0.087$ ) en la relación con la presencia de articulaciones dolorosas.
- Haplotipo 3: DKK-1 rs1896368 GA + LRP-5 rs3736228 CT, no tuvo relación con ningún marcador serológico ni de actividad de la enfermedad.
- Haplotipo 4: SOST rs6503475 GA + LRP-5 rs3736228 CT, no tuvo relación con ningún marcador serológico ni de actividad de la enfermedad.

Adicionalmente se evaluó, si la combinación de varios SNPs se relacionaba con los marcadores serológicos y de actividad, evidenciándose que, presentar 3 SNPs se encuentra relacionado con los niveles de VSG ( $p=0.048$ ); presentar 4 SNPs presentó diferencias estadísticas en el análisis bivariado con mayor puntuación obtenida del índice que evalúa la capacidad funcional denominado HAQ ( $p=0.011$ ), así como tendencia a la significancia con los niveles de VSG ( $p=0.089$ ) y finalmente se encontró relación del índice de actividad SDAI con la presencia de 5 SNPs de los pacientes de ART ( $p=0.024$ ). Sin sostenerse estos resultados como franca asociación por modelos de regresión.

Por otro lado se evaluó en familiares de primer grado de consanguinidad de pacientes con ART la presencia de marcadores serológicos y el estado clínico articular en el momento de la evaluación en el estudio y se encontró que el SNP DKK-1 rs1896367 presentó una relación con los niveles de VSG ( $p=0.040$ ), el SNP KREMEN rs132274 se relacionó con la presencia de articulaciones inflamadas ( $p=0.25$ ); adicionalmente, presentar 3 SNPs tuvo tendencia a ser significativo con los niveles de PCR ( $p=0.089$ ), mientras que presentar 5 SNPs tuvo tendencia a la significancia con los niveles de VSG ( $p=0.071$ ). Por último, se encontraron diferencias estadísticas con el IMC el SNP DKK-1 rs1896368 ( $p=0.009$ ), el presentar

4 SNPs ( $p=0.042$ ), y tuvo tendencia a ser significativo el presentar 2 SNPs ( $p=0.051$ ). Sin embargo, estas asociaciones no se mantuvieron en el modelo de regresión.

#### **4.5. ASOCIACIÓN ENTRE EL PERFIL DE AUTO ANTICUERPOS ANTI-CCP, ANTI CARP, FACTOR REUMATOIDE Y HLA EN PACIENTES CON AR TEMPRANA Y FAMILIARES DE PRIMER GRADO CON LA PRESENCIA DE POLIMORFISMOS DE LOS GENES DKK-1, SOST, KREMEN Y LRP-5.**

##### **4.5.1. Pacientes con AR temprana**

Se analizó el perfil de auto anticuerpos y la asociación con los genotipos de cada uno de los genes propuestos en el grupo de ART y se evidenció que para el gen DKK-1 el SNP rs1896367 no se encontraron asociaciones, sin embargo, el estado nativo GG presentó niveles de FR positivos y positivos altos en una frecuencia del 18.2% y 15.2% de los pacientes, mayor que en los demás genotipos. Para los anti CCP, el estado nativo presentó menor a 20 unidades en el 31.8% de los pacientes y el 27.2% presentaron niveles entre 20 y 59 unidades; por su parte, los anticuerpos anti CarP, el estado nativo presentó un nivel mayor a 20 unidades en un 29.8% y niveles negativos en un 28.1%. Frente a la presencia de HLA DRB1 EC, encontramos que el 41.7 % de los pacientes con genotipo nativo tenían al menos un alelo EC, para la variante homocigota AA, el 5% y para la variante heterocigota GA un 20%.

Para el SNP DKK-1 rs1896368 el genotipo con las variantes homocigota AA y heterocigota GA, presentaron niveles de FR positivos y positivos altos en un 25.7% y un 25.8% respectivamente; los niveles de anti CCP fueron negativos en el 22.7% del genotipo homocigoto y en el 27.3% del genotipo heterocigoto. Igualmente, los anti CarP fueron negativos en el 50.9% de los individuos con presencia de la variante. No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con el perfil de auto anticuerpos. Respecto a la presencia de HLA DRB1 EC, 25.0% de los pacientes con genotipo homocigoto AA presentaron 2 alelos de EC simultáneamente, así como el genotipo heterocigoto GA, presentó 2 alelos de EC en un 21.7%; sin embargo, no se encontraron asociaciones estadísticas.

El SNP DKK-1 rs1528873 el genotipo nativo TT, presentó un 34.9% de FR positivo y positivo alto, mientras que las variantes, homocigota GG y heterocigota GT,

presentaron el 19.7% y 1.5% respectivamente. La presencia de valores mayores a 20 unidades de anti CCP para el genotipo nativo fue del 27.3%, sin embargo, los pacientes con este genotipo también presentaron anti CCP negativos en un 34.8%. Por su parte la presencia de anti CarP mayor a 20 unidades se presentó en el 24.6% del genotipo nativo y en el 21.1% de los individuos con la variante homocigota. No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas. La presencia de HLA DRB1 EC en el genotipo nativo se encontró que el 35% presentaron 2 alelos EC, y el 41.6% presentó al menos 1 alelo de EC y en menor frecuencia se presentaron 2 alelos en la variante homocigota (18.3%), sin diferencias estadísticas significativas.

Frente a los hallazgos del análisis estadísticos del SNP SOST rs6503475 se encontró diferencia estadísticamente significativa con los niveles de anticuerpos anti CarP ( $p=0.027$ ) encontrándose el 17.5% en pacientes con la variante heterocigota, y una tendencia a la significancia en los niveles de los anticuerpos contra el péptido carbamylado 2 anti-Ca-Fib2 ( $p=0.079$ ); por su parte los niveles de FR positivo y positivo alto estuvieron presentes en el 28.8% de los pacientes con la variante heterocigota GA y homocigota AA solo en 15.2%. Los anti CCP con niveles negativos se encontraron en mayor frecuencia en el genotipo AG (33.3%), y tan solo el 24.2% tuvieron niveles mayores a 20 unidades considerados positivos. Ninguno de los resultados anteriores demostró resultados estadísticamente significativos

Respecto al HLA DRB1 EC, se evidenció que el 36.7% de los pacientes con genotipo AG presentaron los 2 alelos de EC, y el 41.6% al menos 1 alelo EC. Sin embargo, no fue estadísticamente significativo.

El SNP KREMEN rs132274 no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas, los pacientes con la variante en estado homocigoto TT y heterocigoto CT presentaron en mayor frecuencia de niveles negativos de FR, anti CCP y anti CarP; y frente al HLA DRB1 EC el 28.3% de los pacientes con genotipo con variante homocigota, presentaron 2 alelos, y en un 25% los heterocigotos. Sin establecerse diferencias estadísticamente significativas.

Finalmente, para el SNP LRP-5 rs3736228 se encontraron niveles de FR positivo y positivo alto en el 34.9% de los pacientes con el genotipo nativo CC, los pacientes con la variante presentaron FR negativo, los anti CCP se encontraron negativos en el 36.4% de los pacientes con genotipo nativo y tan solo el 29.8% de estos, presentaron anti CarP superior a 20 unidades. No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas. Respecto a la presencia de HLA DRB1 EC el 46.6%

de los pacientes con genotipo nativo tenían al menos un alelo EC, y el 38.3% presentaron los 2 alelos simultáneamente, sin ser estadísticamente significativos.

Se plantearon 4 haplotipos en base a su frecuencia genotípica en pacientes con ART y controles:

- Haplotipo 1: Tener las variantes DKK-1 rs1896367 + rs1528873, tuvo tendencia estadística interesante con los anti Ca-Fib3 ( $p=0.079$ )
- Haplotipo 2: DKK-1 rs1896368 GA + SOST rs6503475 GA + LRP-5 rs3736228 CT, se relacionó con los niveles de FR ( $p=0.032$ )
- Haplotipo 3: DKK-1 rs1896368 GA + LRP-5 rs3736228 CT, no tuvo asociación con ningún auto anticuerpo.
- Haplotipo 4: SOST rs6503475 GA + LRP-5 rs3736228 CT, se encontró tendencia a ser significativo con la presencia de anti CarP ( $p=0.051$ ).

Adicionalmente, presentar 4 SNPs en el análisis bivariado se asoció con presentar anticuerpos anti Ca-Fib ( $p=0.015$ ).

#### **4.5.2. Familiares en primer grado de consanguinidad de pacientes con AR temprana.**

En familiares de primer grado se evaluaron así mismo la presencia de auto anticuerpos y la asociación con los genotipos de cada uno de los genes involucrados en la vía Wnt/ $\beta$  catenina.

Para el gen DKK-1 el SNP rs1896367 se encontró diferencia estadísticamente significativa con los niveles de FR ( $p=0.017$ ), para los anti CCP  $>20$  tan solo se encontraron valores positivos en el 8% para el genotipo nativo GG y 8% heterocigoto GA. En cuanto a los anti CarP, el 12.8% del genotipo nativo y el 14.9% del genotipo heterocigoto presentaron niveles mayores a 20 unidades. Y finalmente dentro de las variables analizadas, la presencia de HLA DRB1 EC, encontramos que el 24% de los pacientes con genotipo nativo tenían dos alelos EC simultáneamente, mientras que el genotipo heterocigoto el 20% presentó al menos un alelo EC, sin diferencia estadística significativa.

Para el SNP DKK-1 rs1896368 se encontró diferencia estadísticamente significativa con los niveles de FR ( $p=0.046$ ), para el genotipo con la variante homocigota AA y heterocigota GA, presentaron niveles de anti CCP en el 8% y 10% respectivamente. Igualmente, los anti CarP fueron positivos  $>20$  en el 4.3% del genotipo nativo, el

12.8% para la variante homocigoto y el 17% para la variante heterocigota. No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con el perfil de auto anticuerpos. Respecto a la presencia de HLA DRB1 EC, 20% de los pacientes con genotipo variante homocigoto AA presentaron 2 alelos de EC simultáneamente, así como el genotipo heterocigoto GA, presentó 2 alelos de EC en un 18%; sin embargo, no se encontraron asociaciones con el EC.

En los análisis con el SNP DKK-1 rs1528873 no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas para ningún autoanticuerpo; para los 3 genotipos las frecuencias de FR negativos fueron mayores. Respecto a los anti CCP tuvieron el mismo comportamiento que el FR, mientras que la presencia de anti CarP mayor a 20 unidades se presentó en el 17% del genotipo nativo y en el 4.3% de los individuos con la variante homocigota y el 12.8% con la variante heterocigota. En cuanto al HLA DRB1 EC en el genotipo nativo el 26% presentaron 2 alelos EC, frente a un 16% del genotipo variante homocigoto y heterocigoto.

Para el SNP SOST rs6503475 se encontró diferencia estadísticamente significativa con los niveles de anticuerpos contra el péptido carbamylado anti-Fib ( $p=0.023$ ), encontrándose el 17.0% en pacientes con la variante heterocigota GA; los anticuerpos anti CarP >20 unidades se encontraron en el 10% del genotipo nativo y en el 14.9% de los individuos con la variante heterocigota; por su parte, los niveles de FR fueron negativos para los 3 genotipos en mayor frecuencia al igual que los anti CCP. Frente al HLA DRB1 EC, se evidenció que el 26.7% de los pacientes con genotipo AG presentaron los 2 alelos de EC, y el 32% al menos 1 alelo EC. Sin embargo, no fue estadísticamente significativo con este grupo de alelos del HLA.

Para el SNP KREMEN rs132274 no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas, solo el 8% de los pacientes con genotipo heterocigoto presentaron niveles de FR positivos, los anti CCP fueron negativos en el 85% de los pacientes y tan solo el 10% del genotipo heterocigoto presentó niveles >20 unidades; por su parte para el HLA DRB1 EC, el 16% y 18% de los pacientes con genotipo nativo y con variante heterocigota, presentaron 2 alelos.

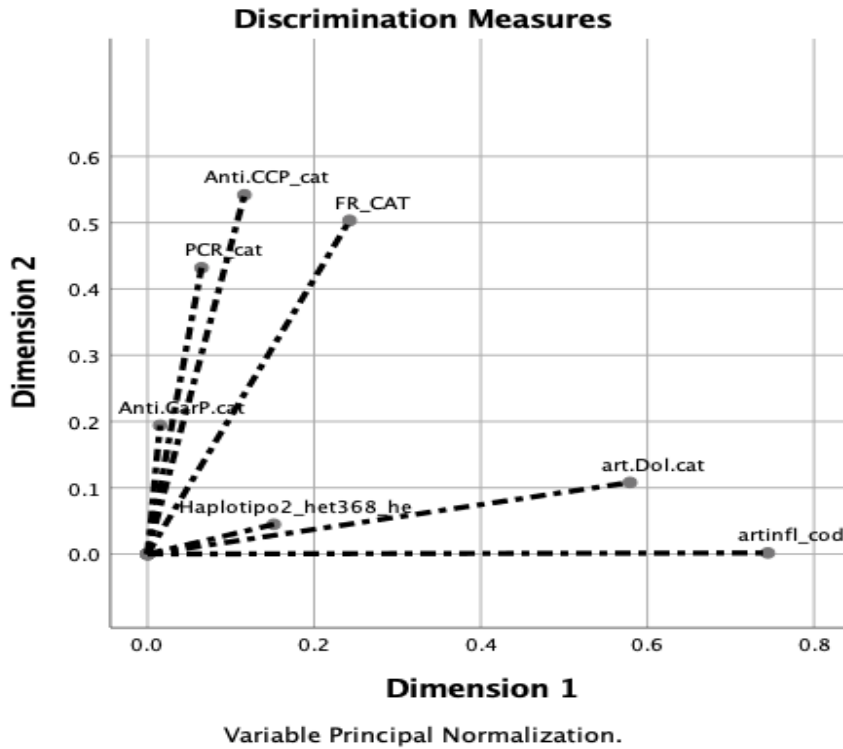
Finalmente, para el SNP LRP-5 rs3736228 se encontraron niveles de FR positivos tan solo en el 2% de los 3 genotipos, para los anti CCP el 12% del genotipo nativo presentó niveles >20 unidades y para los anti CarP el genotipo nativo presentó en un 21.3% niveles superiores a 20 unidades. No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas. Respecto a la presencia de HLA DRB1 EC, se asoció con la presencia de al menos 1 alelo de EC y el 26% del genotipo nativo

presentó los 2 alelos simultáneamente. Sin embargo, dicha asociación no se mantuvo.

En la evaluación de asociación del número de SNPs se encontró que presentar 2 SNPs presento diferencias estadísticas en el análisis bivariado con los niveles de FR ( $p=0.073$ ), 3 SNPs con Anti Ca-Fib2 ( $p=0.034$ ) y anti Ca-Fib3 ( $p=0.013$ ) y 6 SNPs con presentar al menos un alelo de HLA DRB1 EC ( $p=0.035$ ). Sin sostenerse este resultado en el análisis de regresión logística.

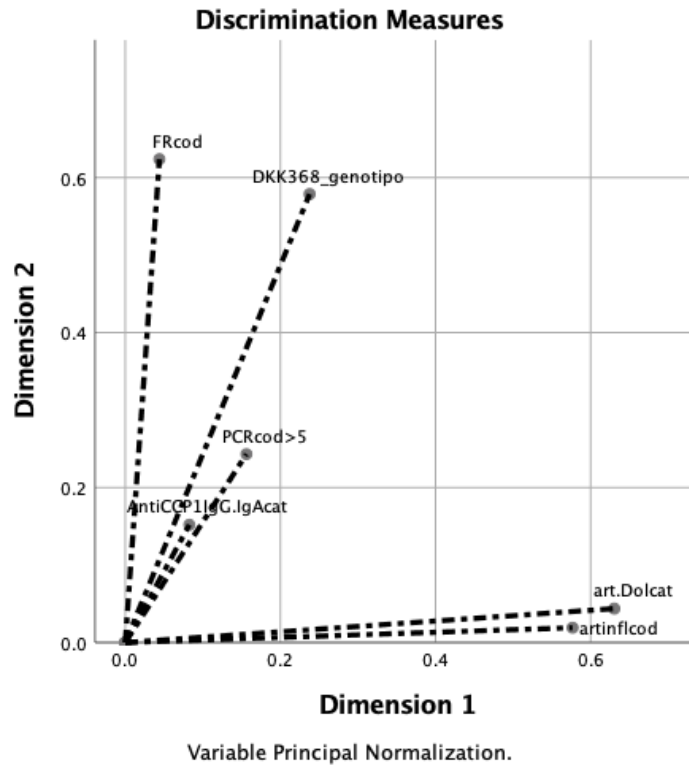
#### **4.5.3. Resultados del análisis multivariado**

Para el análisis multivariado se diseñó un modelo de regresión logística multinomial para cada una de las variantes génicas (DKK-1896367, DKK-1896368 y SOST rs6503475) o variables compuestas (haplotipo 2, haplotipo 4, 3SNP, 4SNP en ART) que mostraron algún nivel de relación con el diagnóstico reumatológico y/o la presencia de anti-CCP, PCR, anti-CarP, IMC, articulaciones inflamadas y articulaciones dolorosas. Sin embargo, los resultados obtenidos no mostraron el sostenimiento de ninguna de las asociaciones observadas en el análisis bivariado. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se diseñó un MCDA en el contexto de cada una de las condiciones evaluadas (ART o familiares), con el fin de explorar los posibles patrones de comportamiento de las variantes génicas dentro de cada diagnóstico. En el contexto de la artritis temprana, todos los modelos de análisis de correspondencias múltiples mostraron un alfa de Cronbach por debajo de 0.6, y no mostraron algún efecto de la presencia de las variantes génicas sobre las variables reumatológicas. Como se observa en la figura 13, las variables de laboratorio se agrupan en una misma dimensión, en donde el aporte más importante asociado al diagnóstico se da por la presencia de anticuerpos anti-CCP y el factor reumatoide en contraste con una segunda dimensión, en donde se agrupan las variables relacionadas con la clínica del paciente, no obstante, no es evidente alguna influencia de la presencia de la variable compuesta haplotipo-2, la cual presenta un coeficiente de correlación menor a 0.2, efecto que puede deberse al tamaño de la muestra. Este mismo fenómeno fue observado para todas las variantes génicas y variables compuestas incluidas en el análisis multivariado.



**Figura 13. MCDA para haplotipo 2 en pacientes con ART.** El modelo mostró un coeficiente de confiabilidad Alfa de Cronbach de 0,543 y mostró dos dimensiones: una dimensión 1 (Dim1) que recogía las variables articulaciones dolorosas (CC 0,579), articulaciones inflamadas (CC 0,745), el haplotipo 2 (CC 0,152), y una Dim-2 que se relaciona con la presencia de FR (CC 0,503), PCR (CC 0,432) y Anti-CCP (CC 0,542).

De la misma manera, los modelos realizados en el contexto de los FDR, permiten observar coeficientes de correlación de Cronbach inferiores a 0.5 invalidando cada uno de ellos. No obstante, como se observa en la figura 14, para la variante DKK-rs1896368 se observa una tendencia de correlación con FR en este grupo de individuos con riesgo genético a desarrollar artritis.



**Figura 14. MCDA para DKK-368 en familiares.** El modelo mostró un coeficiente de confiabilidad Alfa de Cronbach de 0,492 y mostró dos dimensiones: una dimensión 1 (Dim1) que recogía las variables articulaciones dolorosas (CC 0,630) y articulaciones inflamadas (CC 0,577), y una Dim-2 que se relaciona con la presencia de DKK-368 (CC 0,579) y FR (CC 0,624).



## 5. DISCUSIÓN

La vía de señalización Wnt/ $\beta$  catenina o vía canónica, comprende un conjunto de proteínas que participan en procesos del desarrollo embrionario, homeostasis y regeneración del tejido adulto; cuya regulación anormal se encuentra relacionada con la presentación de diversas enfermedades. Esta vía de señalización se encuentra principalmente relacionada con los procesos de proliferación y el desarrollo de diferentes órganos como pulmón, angiocarcinoma, hueso, neuronas e hígado. (Liu et al., 2022)

El papel principal de la vía canónica Wnt en la homeostasis ósea se encuentra relacionado con la proliferación y diferenciación de las células stem mesenquimales y las células progenitoras de los osteoblastos, así como en la activación de los osteoclastos para la resorción ósea (Baron, R. & Kneissel, M.2013). A nivel del osteoblasto, esta vía regula la osteoblastogénesis y la expresión de Osteoprotegerina (OPG), esta última impidiendo la unión del RANKL a su receptor en la superficie celular de osteoclastos y sus precursores, disminuyendo el número de osteoclastos. (Glass et al., 2005, Maruotti et al.,2013).

La señalización de la vía canónica Wnt, es activada por la unión de proteínas Wnt y es traducida por dos familias de receptores transmembranales, las proteínas Frizzled y las proteínas relacionadas con el receptor de lipoproteínas 5 y 6 (LRP-5/6), esta señal se transmite de manera intracelular con el fin de estabilizar la  $\beta$  catenina, esta se transloque a núcleo y se activen genes de diferenciación y proliferación; su inhibición está dada por proteínas como la Esclerostina y la proteína secretada Dickkopf1 (DKK-1) que al unirse a LRP-5/6 y en conjunto con la proteína transmembrana KREMEN, la cual tiene alta afinidad por DKK-1, facilita el bloqueo de la señalización. (Mao et al., 2002, Lim et al., 2021; Corrado et al., 2017).

El rol de la vía Wnt/ $\beta$  catenina ha cobrado gran importancia y ha sido implicada en diversas enfermedades de naturaleza inflamatoria como la espondiloartritis y autoinmune como el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis sistémica, la psoriasis y la artritis reumatoide contribuyendo en su etiopatogenia (Maruotti et al., 2013).

En la artritis reumatoide, la destrucción articular se encuentra asociada a diversos mecanismos inflamatorios, celulares y vías de señalización, entre estas, se ha

demostrado que la vía Wnt puede regular el grado de resorción ósea (Polzer et al., 2008). Estudios previos en AR sugieren que el antagonista DKK-1 se encuentra sobre expresado en líquido sinovial y en hueso, así como altos niveles séricos se asocian a altos scores de actividad de la enfermedad y deterioro óseo (Hardy et al., 2012; Juárez et al., 2016, Ray et al., 2017; Rooy et al., 2013).

En relación a lo anterior, se ha descrito que mutaciones en los diferentes componentes de la vía de señalización se encuentran relacionados con procesos de resorción ósea o crecimiento óseo excesivo (Yavropoulou et al., 2007). En AR el componente genético de genes no HLA explica cerca 5.5% de los riesgos genéticos (Okada et al., 2013), por tanto, la identificación de individuos que porten alelos y variantes de riesgo en relación con la progresión de la destrucción articular y actividad de la enfermedad, permitirá dirigir de manera personalizada los tratamientos.

Rooy y colaboradores evaluaron variantes de 4 genes que codifican proteínas involucradas en la vía Wnt/  $\beta$  catenina en relación con la severidad de la progresión de la destrucción articular, incluyeron 1418 pacientes con diagnóstico de AR, se evaluaron radiografías de pies y manos; las variantes fueron evaluadas en 2 fases, que incluyó además un metaanálisis; para DKK-1, en los resultados del metaanálisis de varianza inversa, las variantes que mantuvieron su nivel de significancia corresponden a las variantes rs1896367, rs1896368 y rs1528873, que fueron las seleccionadas en nuestra evaluación. Por su parte para el gen SOST, 3 tuvieron asociación con la progresión articular, sin embargo, en nuestro estudio fue incluido el SNP rs6503475 dado que en el estudio de Rooy y cols., tuvo tendencia a la significancia. Para LRP-5 10 SNPs fueron asociados a la progresión radiológica pero solo 1 fue realizado en las demás cohortes, perdiendo asociación en la fase 2, sin embargo, también fue incluido en nuestro estudio. Finalmente, para KREMEN-1, tan solo el rs132774 tuvo tendencia a la significancia y de igual forma fue incluido en este estudio (Rooy et al., 2013)

En población colombiana, el estudio de estas variantes es limitado tanto en población sana como en relación con la artritis reumatoide; en nuestro estudio se evaluó la presencia de estas variantes genéticas y su relación con la actividad de la enfermedad y presencia de autoanticuerpos, mientras que el estudio de Rooy y colaboradores describió su asociación con el seguimiento de la progresión de la enfermedad.

Un primer acercamiento en la caracterización de variantes de la secuencia del genoma humano en relación a su genotipo y fenotipo, fue el proyecto denominado 1000 genomas y que se convirtió en el resultado de mayor importancia para compararlo con los resultados obtenidos en nuestro estudio. El objetivo del proyecto de 1000 genomas fue describir la localización, la frecuencia alélica y la estructura local del haplotipo de aproximadamente 15 millones de polimorfismos de nucleótido único, 1 millón de pequeñas inserciones y deleciones, y 20.000 variantes estructurales que no habían sido descritas y que pretenden facilitar estudios funcionales y de asociaciones. En dicho proyecto la población de estudio incluída fueron 2500 individuos de diversos países a nivel global. La muestra representativa de Colombia fueron 148 individuos tomados de la población general de la ciudad de Medellín, departamento de Antioquia y fueron incluidos en el grupo de ancestría americana (The 1000 Genomes Project Consortium,2010).

Se ha descrito que, la ancestría de la población colombiana ha estado influenciada por la diversidad de comunidades nativas tanto europeas, africanas y americanas que migraron al continente y diversificaron las etnias en el país en la actualidad, esta influencia genética ha permitido estratificar las regiones del país; basados en la localización geográfica, la región Caribe, Andes y Orinoquía muestran un componente ancestral de origen europeo, sin embargo, la región Andina también muestra un marcado componente americano, así mismo, en las sub regiones de la región de los Andes se describe que los primeros europeos se establecieron en el departamento de Antioquia y posteriormente migraron a los departamentos vecinos. En la región Pacífica su principal ancestría son afrodescendientes y en la región de la Amazonia se presenta un mayor aporte genético por los nativos americanos (Ossa H. et al., 2016)

Nuestro estudio incluyó pacientes con diagnóstico de AR temprana de menos de dos años de evolución y familiares en primer grado de consanguinidad, los cuales fueron analizados frente a grupos control. La identificación de las variantes en relación al estudio de Rooy se realizó y se obtuvieron las frecuencias genotípicas y alélicas.

De manera interesante observamos que el equilibrio de Hardy & Weinberg para la variante de DKK-1 rs1896368 en la población de ART y en su grupo DKK-1 rs1896367; y para el grupo de familiares DKK-1 rs1896367 y KREMEN tanto en familiares como controles, se encontraron desviados del EHW. Se ha descrito que el EHW puede verse alterado por una serie de fuerzas, incluidas las mutaciones, la

selección natural, el apareamiento no aleatorio, la deriva genética, el flujo de genes o estratificación de la población, sin embargo, existen otras causas como problemas en el genotipado que incluye entre estos, el tamaño de la muestra (Royo JL., 2020). Se ha demostrado que, en el estudio de datos genéticos, es requisito esencial para obtener datos reproducibles, tener en cuenta el tamaño de la muestra, dado que en la medida que aumente el tamaño de la muestra, se obtiene mayor reproducibilidad (Maleki, F. et al. 2019), en contraste a esta afirmación, nuestra población de estudio fue limitada por su tamaño de muestra y fue pareada con el grupo control de manera aleatoria, por tanto, las desviaciones encontradas en el EHW pudo estar influenciada por esta razón.

En el análisis de frecuencias de nuestro estudio, para el gen DKK-1, la variante rs1896367 y rs1896368, se obtuvo una frecuencia genotípica sin diferencias estadísticas entre pacientes con ART y los individuos sanos, mientras que para la variante rs1528873 si encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos, sin embargo, en el análisis de la frecuencia alélica no se encontraron diferencias estadísticas. En el estudio de Cardona y colaboradores, quién analizó un primer corte de esta misma población de estudio con ART, para DKK-1 rs1896367, encontró que la presencia de la variante en estado homocigoto estuvo en 25 individuos, mientras que en nuestro estudio se encontraron 39 individuos, para el estado heterocigoto describió la presencia en 25 individuos, similar a lo que encontramos en nuestro estudio, el cual correspondió a 23 individuos (Cardona et al., 2020)

Por su parte el análisis de la frecuencia alélica obtenida en este estudio para rs1896367 es similar a las reportadas en el proyecto 1000 genomas en población sur asiática, europea y americana, cuyas frecuencias se encuentran para el alelo G  $\pm 0.700$  y para el alelo A  $\pm 0.300$  a diferencia de población africana que reporta 0.980 y 0.020 respectivamente evidenciándose en esta población un perfil de variantes diferente frente a las demás ancestrías. La frecuencia alélica analizada en la población colombiana incluida en el proyecto 1000 genomas reportó una frecuencia alélica de G= 0.610 y A=0.390, observándose una leve diferencia a la encontrada en la población incluida en nuestro estudio cuya procedencia fue de la ciudad de Bogotá y para la cual encontramos para el alelo G= 0.765 en ART, 0.727 en controles y 0.710 en familiares, y para el alelo A=0.235 en ART, 0.273 en controles y 0.290 en familiares, la cual puede estar dada por la heterogeneidad de etnias en la capital del país (The 1000 Genomes Project Consortium,2010).

Para la variante DKK-1 rs1896368 la frecuencia alélica reportada en este estudio fue para el alelo G= 0.326 y el alelo A= 0.674 en ART, en población control G=0.318 y A=0.682, y para familiares 0.340 y 0.660 respectivamente; se observa variabilidad frente a la reportada en la población antioqueña la cual reporta para G=0.510 y para A=0.490, la similitud de nuestra población más cercana es con la población europea cuya frecuencia fue 0.480 y 0.520 respectivamente (The 1000 Genomes Project Consortium,2010).

Para la variante DKK-1 rs1528873 se encontró una frecuencia alélica en la población de este estudio para el alelo nativo T= 0.629 y variante G=0.371 en ART, 0.712 y 0.288 en controles y en familiares 0.710 y 0.290 respectivamente, para esta variante se encuentra bastante heterogeneidad en las diferentes poblaciones, en población americana que incluyó individuos de México, Perú y Puerto Rico en promedio presentan 0.610 y 0.390 respectivamente, a diferencia del SNP rs1896367, la frecuencia alélica de rs1528873 tiene mayor similitud a los reportados en población africana (T=0.690, G=0.310) (The 1000 Genomes Project Consortium,2010).

Respecto a la variante de SOST rs6503475 no se encontraron diferencias en la frecuencia genotípica y alélica entre los pacientes con ART y controles y en familiares y sus controles. La frecuencia alélica reportada en este estudio es similar a la reportada en población asiática y africana (G=0.550, A=0.455; G=0.588, A=0.412 respectivamente), mientras que en la población antioqueña se reporta (G=0.450, A=0.550) una ligera variación respecto a lo encontrado en este estudio (ART G=0.515, A=0.485; Familiares G=0.560, A=0.440) (The 1000 Genomes Project Consortium,2010).

En la variante de KREMEN rs132274 encontramos diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia alélica entre el grupo de familiares y su grupo control; las frecuencias reportadas en 1000 genomas se encuentran en igual distribución en las diferentes poblaciones, europeos, sur asiáticos, asiáticos orientales y americanos (C=±0,320; T=±0.680), sin embargo en población africana se encuentra una frecuencia diferente (C=0.850; T=0.150), el comportamiento en la frecuencia de nuestra población fue similar a la generalidad de las poblaciones (The 1000 Genomes Project Consortium,2010).

Frente a la variante de LRP-5 rs3736228, encontramos diferencia estadísticamente significativa entre el grupo de familiares y sus controles, sin embargo, la frecuencia

reportada en nuestro estudio es similar en general a todas las poblaciones, aunque nuevamente, en la población africana se observa un ligero incremento ( $C=0.980$ ;  $T=0,020$ ) frente a lo obtenido en las demás poblaciones ( $C=\pm 0,850$ ;  $T=\pm 0.150$ ) (The 1000 Genomes Project Consortium, 2010).

Como se mencionó, se encontraron diferencias en nuestra población de estudio frente a la población colombiana incluida en proyecto 1000 genomas, nuestra población tenía en su mayoría procedencia de la ciudad de Bogotá, la cual está ubicada en la zona central de Colombia, región caracterizada por una alta tasa de migración desde las zonas rurales y marginales del país debido a fenómenos sociopolíticos.

Dentro de la misma línea de investigación en relación con la artritis reumatoide, se ha evidenciado que la prevalencia de enfermedad periodontal en pacientes con AR es alta, sugiriendo una asociación entre estas dos entidades (Cardona et al., 2020). Así mismo, Napimoga y colaboradores han estudiado la importancia de los reguladores de la vía Wnt en la periodontitis crónica donde han encontrado niveles séricos y locales de DKK-1 y SOST relacionado con la pérdida ósea de la enfermedad periodontal (Napimoga et al., 2014); por lo anterior, un estudio desarrollado alternamente en el grupo de investigación, Ospina y colaboradores evaluaron la presencia de estos polimorfismos en 157 individuos colombianos sistémicamente sanos, con y sin enfermedad periodontal, encontrándose similitud en las frecuencias genotípicas reportadas para la variante DKK-1 rs1896367, SOST rs6503475, LRP-5 rs3736228 en controles. Para la variante DKK-1 rs1896368, las frecuencias reportadas en nuestra población control (GG:13.6%, AA:50%, GA:36.4%) mostraron una variación respecto a lo encontrado en el estudio de enfermedad periodontal con individuos sistémicamente sanos (GG:19.75%, AA:35.03%, GA:45.22%) (Ospina et al., 2018).

Para la variante DKK-1 rs1528873 se encontraron similitudes frente a la frecuencia reportada tanto en controles de nuestro estudio y los individuos sistémicamente sanos del estudio de Ospina y colaboradores, sin embargo, se evidenció que los pacientes con ART de nuestro estudio, presentaban frecuencias diferentes en el genotipo de la variante homocigota y heterocigota descritos en los individuos sanos del estudio de Ospina (TT: 59.51%, GG:2.55%, TG:45.86%) (Ospina et al., 2018).

Finalmente, para la variante KREMEN rs132274 no se encontraron variaciones en la población control de nuestro estudio frente a lo encontrado en población sistémicamente sana del estudio de Ospina (Ospina et al., 2018).

Por otra parte, se ha descrito que la obesidad y el sobrepeso juega un rol importante en la contribución en el estado crónico inflamatorio en la AR, cerca del 50 % de los pacientes con AR presenta sobrepeso u obesidad (Naranjo et al., 2008); en nuestra población se encontró que más del 50% de los pacientes se encontraban en estado de sobrepeso u obesidad. En relación con la vía Wnt y sus componentes se ha descrito que se encuentran involucrados en los procesos de adipogénesis y participa de manera dual en procesos anti inflamatorios y pro inflamatorios (Ma et al., 2016). Dentro del microambiente pro inflamatorio la secreción de interleuquinas promueve la inflamación y favorece la obesidad y la diabetes (Singh et al., 2019). Un estudio en modelo murino demuestra que DKK-1 se encuentra relacionada con la pérdida ósea inducida por obesidad, demostrándose una reducción significativa de la masa ósea trabecular y en la tasa de formación ósea (Colditz et al., 2020), así mismo, se ha encontrado mayores niveles de SOST en pacientes con pre diabetes y diabetes mellitus tipo 2 (Daniele et al., 2015), y mutaciones en genes de LRP-5 se han asociado a riesgo de resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo 2 (Saarinen et al., 2010), los estudios en relación con variantes genéticas de la vía Wnt, AR y sobre peso u obesidad son escasos, en nuestro estudio aunque no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas, la variante DKK rs1896368 en pacientes de ART tuvo tendencia a ser significativo, resultados previos de nuestro estudio publicado por Cardona y cols., se encontró mayor frecuencia de sobrepeso en individuos con la variante rs1896368 (Cardona et al., 2020).

El principal determinante genético en el desarrollo de la AR, es el EC, y se ha descrito que en fumadores con al menos una copia de EC, incrementaba el riesgo 5,5 (IC 95%: 3-10) y a 15,7 (IC 95%: 7,2-34,2) cuando había 2 copias de EC en pacientes seropositivos (Ruiz-Esqvide & Sanmartí, 2012); frente a genes no-HLA, se ha descrito que PTPN22 y PADI4 se encuentran asociados a con la presencia de anticuerpos anti-CCP en fumadores sugiriendo interacción entre diversos factores de riesgo (Westra et al., 2018; Kochi et al., 2011); sin embargo, en relación a la vía Wnt y sus variantes, los estudios son limitados; a nivel sérico se ha descrito que niveles de DKK-1, tienen tendencia a la significancia en la comparación entre fumadores y no fumadores (Seror et al., 2016) y en población colombiana se

encontró asociación significativa con el consumo de cigarrillo (Santos et al., 2017). A pesar del peso que tiene el EC en el desarrollo y progresión de la AR no encontramos relación con las variantes estudiadas.

Las alteraciones reumatológicas y el daño articular conllevan a mayor progresión radiológica encontrándose relacionado con el deterioro funcional, además de, las anomalías serológicas en los reactantes de fase aguda; en relación a la vía Wnt, la asociación de variantes genéticas con marcadores de inflamación y evaluación de articulación son escasos, este es el primer estudio en población colombiana que incluye variantes de 4 genes de la vía Wnt en individuos con menos de dos años de evolución, y que a pesar de no encontrarse asociaciones estadísticas significativas, en la variantes de SOST, presentó en el análisis bivariado una relación con los niveles de PCR, así como la variante de LRP-5 en los pacientes de ART; de igual forma, la presencia y combinación de varios SNPs se relacionaron con los niveles de VSG.

Estudios previos en AR han evaluado los niveles séricos tanto de DKK-1 y SOST, encontrándose una correlación significativa de SOST y DKK-1, con PCR y VSG (Singh et al., 2019; Wang et al., 2011) contrariamente, al estudio de Cardona y cols., en el cual no se evidenció ninguna asociación con los reactantes de fase aguda (Cardona et al., 2020)

Por su parte frente a los índices de actividad de la enfermedad, los niveles séricos de SOST, se encuentran significativamente correlacionados con puntaje de DAS28 y MHAQ, así como los niveles de DKK-1 fueron significativamente altos en pacientes con AR severa y con alta puntuación de DAS28 (Singh et al., 2019) contrariamente a los encontrados por Santos y cols., y Cardona y cols., los cuales no encontraron asociación con los índices de actividad (Cardona et al., 2020; Santos et al., 2017)

En este estudio la evaluación de articulaciones dolorosas e inflamadas no mostró asociaciones con la presencia de cada variante en relación a la vía Wnt en pacientes de ART, sin embargo, a pesar de que no se establecieron asociaciones estadísticas la combinación de SNPs se encontraron relacionados por el análisis bivariado con el puntaje SDAI y con la puntuación de MHAQ; y aunque en este estudio no se incluyó la evaluación radiológica como medida de destrucción articular, la medición del estado funcional y de discapacidad, se encuentra relacionado con el deterioro óseo y la progresión de la enfermedad; por tanto Santos y cols., encontraron que



los niveles de DKK-1 en AR establecida, población con más años de evolución que la incluida en nuestro estudio, estuvieron asociados con un menor estado funcional y discapacidad severa por MD-HAQ, además de asociarse con osteoporosis indicando mayor daño estructural (Santos et al., 2017); así como en patologías como la osteoartritis primaria que, relaciona también mayores niveles de DKK-1 en líquido sinovial con la severidad de la destrucción articular (Theologis et al., 2017). En nuestro estudio se encontró que la combinación de 4 SNPs de los componentes de la vía Wnt, está relacionado con mayor discapacidad y estado funcional. Por lo cual es importante extender estudios en grupo de mayor tamaño de sujetos evaluados.

Por su parte la severidad de la enfermedad se encuentra relacionada con la destrucción articular a través del tiempo, de Rooy y cols., proponen que las variantes de las proteínas Wnt están asociadas a la progresión radiológica, estimando que la asociación con los SNPs de DKK-1 representa un 23% de incremento de la tasa de la destrucción articular durante los 7 años de seguimiento en un modelo aditivo del alelo menor, siendo la variante rs1896368, la que mostro más fuerte asociación ( $p < 0.001$ ) y mayores niveles séricos de DKK-1 (de Rooy et al., 2013); sin embargo, en la publicación previa de nuestros resultados se encontró contrariamente que la variante rs1896367 tenía relación con mayor frecuencia de erosiones y disminución del espacio articular en pies y mayor puntuación por los scores radiográficos SHS (Sharp–van der Heijde score) y SENS (Simple Erosion Narrowing Score), mientras que pacientes homocigotos para rs1896368 tenían menor frecuencia de erosiones, disminución del espacio articular en manos y pies y la condición de heterocigoto presentaron mayor erosiones en la escala de SENS (Cardona et al., 2020); en nuestro estudio aunque no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas, la variante rs1896368 en estado homocigoto y heterocigoto presentó mayor porcentaje de articulaciones dolorosas e inflamadas y mayor porcentaje de individuos con índices de actividad SDAI  $> 11$  y DAS28\_VSG  $> 3.2$ , sugiriendo que probablemente puede relacionarse con la actividad de la enfermedad.

En el caso de SOST rs6503475, de Rooy y cols., identificaron que la presencia de dos alelos menores en un modelo recesivo presentaba 1.04 veces incremento en la tasa de progresión por año, pero no encontraron asociación frente a los niveles séricos de Esclerostina (de Rooy et al., 2013). En nuestro estudio esta variable en estado heterocigoto presento una frecuencia más alta de individuos que

presentaban >1 articulación dolorosa e inflamada, así como con SDAI >11 y DAS28\_VSG >3.2 aunque, sin asociación estadísticamente significativa, fue similar a lo encontrado por Seror y cols., los cuales no encontraron niveles de SOST asociados a ningún parámetro de actividad de la enfermedad ni al daño estructural articular. Sin embargo, esta variante en otras patologías como la esclerosteosis conlleva a una producción excesiva ósea (Van Lierop et al., 2011), así como en la enfermedad de Van Buchem, donde la delección en este mismo gen resulta en la producción defectuosa de esta misma (Staebling-Hampton et al., 2002). Lo cual plantea un efecto diferencial de acuerdo a la naturaleza del compromiso óseo.

Frente a la variante de KREMEN en el estudio de Rooy, estuvo en el límite de significancia en relación a la progresión radiológica, la cual se perdió en la corrección estadística (de Rooy et al., 2013); en nuestro estudio se encontró un ligero incremento de la frecuencia de individuos de la variante en estado homocigoto en relación a articulaciones inflamadas, dolorosas, SDAI >11 y DAS28\_VSG >3.2, aunque no se encontraron asociaciones estadísticamente significativas. Por lo cual posiblemente las variantes de este gen poco tienen implicación en la progresión radiológica de los pacientes con diagnóstico de AR.

Frente a LRP-5 rs3736228 en nuestro estudio se identificó que, aunque no hubo asociaciones, la frecuencia de individuos con la variante en estado nativo fue mayor respecto a la presencia de articulaciones dolorosas e inflamadas, así como mayor frecuencia de individuos con SDAI >11 y DAS28\_VSG >3.2, en comparación con el estudio de Rooy que no mostro asociaciones significativas con el deterioro articular (de Rooy et al., 2013). Pinzone y cols., describen que mutaciones en este correceptor, causa el síndrome familiar osteoporosis-pseudoglioma caracterizado por una disminución ósea y subsecuentemente la generación de fracturas (Pinzone et al., 2009), mientras que Balemans y cols., refieren que los estudios genéticos realizados en dos familias no emparentadas de origen caucásico que presentaron un fenotipo de alta densidad ósea, se segregaron como un rasgo autosómico dominante, y por tanto dicha mutación le profiere una función de ganancia generando un aumento en la masa ósea (Balemans et al., 2007), apoyando la evidencia que la presencia de SNPs en el gen de LRP-5 influye en el metabolismo óseo (Schulze et al., 2010).

Desde hace varios años, la búsqueda para entender la fisiopatología de la AR ha propuesto dentro del modelo de autoinmunidad, la presencia de diversos autoanticuerpos que en fases preclínicas y clínicas pueden ser predictores de la

enfermedad (Rantapää-Dahlqvist et al., 2003; Bos et al., 2010; Shi et al., 2013), entre estos el FR, los anti-CCP y los más recientes estudiados anticuerpos anti CarP. En este estudio la frecuencia y los niveles de estos auto anticuerpos en pacientes de ART fueron estadísticamente significativos frente a controles sanos como era de esperarse, similar a lo encontrado por Alessandri y cols., por tanto, son marcadores que se encuentran en fases iniciales de la enfermedad (Alessandri et al., 2015).

Frente al grupo de familiares en este estudio, entendiendo a este grupo como grupo sano con un riesgo de desarrollo de la enfermedad, es interesante mencionar que en ellos se encontró que la variante DKK rs1896368 se relacionó con el IMC, así como lo encontrado en resultados previos de nuestro estudio publicado por Cardona y cols., en cual evidenció mayor frecuencia de sobrepeso en individuos con la variante rs1896368 (Cardona et al., 2020). En población colombiana de familiares se ha descrito mayor presencia de obesidad (Unriza-Puin S et al., 2016); por tanto, cobra mayor importancia que ante una probabilidad alta de susceptibilidad genética, la enfermedad puede estar influenciada por otros factores epigenéticos como la obesidad y el sobrepeso, además de variantes de la vía Wnt. Así mismo, la variante DKK-1 rs1896367 tuvo relación con los niveles elevados de VSG. Adicionalmente, se encontró un 44% de los individuos presentaban más de 1 articulación dolorosa, teniendo tendencia a la significancia frente al grupo control y un 14% de los individuos presentaba más de 1 articulación inflamada; un porcentaje ligeramente mayor al encontrado por Sparks y cols., quien evaluó signos de inflamación articular asociados a otros factores de riesgo, encontrando un 23% de presencia de al menos una articulación dolorosa/inflamada, el 8.3% tenían más de 1 articulación inflamada y el 20.2% tenían más de 1 articulación dolorosa, y se asoció con el consumo de cigarrillo y la edad (Sparks et al., 2016). En este grupo no se encontraron diferencias para FR y anti CCP, sin embargo, la presencia de anticuerpos anti CarP mostraron diferencias estadísticamente significativas frente a controles, lo que refuerza que podría ser considerado como un biomarcador temprano antes del desarrollo en la enfermedad como lo proponen otros estudios (Chila et al., 2020; Alessandri et al., 2015). En relación a la vía Wnt, encontramos diferencias de SOST rs6503475 con la presencia de anticuerpos anti CarP positivos y una tendencia a la significancia con anti-Ca-Fib2, así como en el haplotipo que lleva también la variante de SOST, mientras que en familiares presentó relación con anti-Fib, lo que podríamos proponer como tema de estudio en grupos de riesgo para aportar en la patogénesis

de la AR, ya que, en la literatura los estudios que incluyan la vía Wnt y anti CarP son muy limitados.

A pesar de que no se encontraron asociaciones entre las variantes de la vía Wnt con índices de actividad reumatológica, autoanticuerpos y HLA en pacientes con ART y familiares en primer grado. Los resultados de las frecuencias genotípicas y alélicas y estos resultados con variables clínicas de este estudio nos inducen a plantear que estas variantes se deben seguir estudiado en grupos de ART y familiares, con mayor tamaño de muestra y en diferentes momentos del curso de la enfermedad, realizando estudios de seguimiento que nos permitan evaluar la progresión de la enfermedad.

La presencia o ausencia de factores genéticos y marcadores que permitan establecer un pronóstico de la enfermedad, conllevan a diversificar las estrategias terapéuticas con el objetivo de evitar una mayor progresión o prevenir la enfermedad, incrementando las perspectivas de la fisiopatología, y que puedan contribuir a la búsqueda del manejo en la medicina traslacional.

En conclusión, los resultados de las variantes de estos 4 genes demuestran similitudes con las variantes encontradas en poblaciones americanas y europeas frente a la población mestiza analizada, provenientes principalmente de Bogotá conocida como representativa de la región central, zona más densamente poblada de Colombia teniendo una alta variabilidad triétnica, siendo predominante el componente europeo, un componente africano y nativo americano (58% europeo, 34% africano y nativo americano en 8%) (Ossa et al., 2016) y algunas diferencias entre la población de referencia del estudio de los 1000 genomas con individuos de Medellín y la de Bogotá fue encontrada, dado por el intenso flujo genético y cultural de esta ciudad, principalmente por su ubicación geográfica, con una alta tasa de migración desde las zonas rurales y marginales del país debido a fenómenos sociopolíticos generando una notable heterogeneidad entre regiones geográficas.

## 6. CONCLUSIONES

Existen pocos estudios sobre la evaluación y caracterización de las variantes de esta vía, en población sana y en asociación con enfermedades en otras latitudes y mucho más en nuestra población, en nuestro estudio se presentaron frecuencias alélicas similares a las reportadas en el estudio de los 1000 genomas en población europea y americana, para las variantes DKK-1 rs1896367, rs1896368, KREMEN rs132774 y LRP-5 rs3736228; y similar a la población asiática y africana las variantes DKK-1 rs1528873 y SOST rs6503475; frente a la población de Medellín se encontraron ligeras diferencias frente a nuestra población para las variantes DKK-1 rs1896367, rs1896368 y SOST rs6503475 . Lo cual puede estar enmarcado por las diferencias en los ancestros de la población de Medellín y Bogotá.

No se encontró ninguna variante de la vía Wnt/ $\beta$  como factor de riesgo para el desarrollo de AR o mayor grado de actividad o nivel de anticuerpos. Sin embargo, la variante de SOST, presente en los pacientes con ART diferencias para los anticuerpos anti CarP y PCR, así mismo los haplotipos que incluían la variante de SOST, presentaron tendencia a la significancia frente a articulaciones dolorosas, FR y anti CarP. La combinación de 3, 4 y 5 SNPs presentó diferencias estadísticas con marcadores de inflamación y mayor disfuncionalidad en análisis bivariado. Por lo tanto, es necesario ampliar el tamaño de muestra y evaluar un grupo de pacientes con diferentes grados de actividad y tiempos de evolución de la enfermedad.

En familiares en primer grado de consanguinidad de pacientes con artritis reumatoide no se encontró ninguna variante como factor de riesgo que se asociara con presencia de autoanticuerpos o variables clínicas articulares. Sin embargo, la presencia de SNPs de DKK-1 presentaron diferencias con marcadores de inflamación y niveles de FR, SOST y presentar 3 SNPs se relacionaron con los anticuerpos dirigidos contra péptidos carbamylados, marcadores de inflamación e IMC. Lo cual sugiere evaluar estas variantes en un grupo con mayor tamaño en este grupo de riesgo genético para el desarrollo de artritis reumatoide.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alam, J., Jantan I., Abbas S. Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy. *Biomed. Pharmacother.* 2017; 92, 615-633. doi: 10.1016/j.biopha.2017.05.055
- Alessandri C, Bartosiewicz I, Pendolino M, Mancini R, Colasanti T, Pecani A, Morello F, Mastrangelo A, Sabatinelli D, Riccieri V, Di Franco M, Ceccarelli F, Perricone C, Conti F, Valesini G. Anti-carbamylated protein antibodies in unaffected first-degree relatives of rheumatoid arthritis patients: lack of correlation with anti-cyclic citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor. *Clin Exp Rheumatol.* 2015 Nov-Dec;33(6):824-30. Epub 2015 Sep 28. PMID: 26411477.
- Aletaha D., Neogi T., Silman A. et al. Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*, 2010; 62(9), 2569-2581. doi: 10.1002/art.27584
- Aletaha D., Eberl G., Nell V., et al. Practical progress in realisation of early diagnosis and treatment of patients with suspected rheumatoid arthritis: results from two matched questionnaires within three years. *Ann Rheum Dis.* 2002; 61(7), 630-634. doi: 10.1136/ard.61.7.630
- Anaya J., Correa P., Mantilla R. et al. Rheumatoid arthritis association in Colombian population is restricted to HLA-DRB1\*04 QRRAA alleles. *Genes Immun.* 2002; 3, 56–58 doi:10.1038/sj.gene.6363833
- Appel H., Ruiz G., Listing J. et al. Altered skeletal expression of sclerostin and its link to radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* 2009; 60(11), 3257-3262. Doi:10.1002/art.24888
- Arron J., & Choi Y. Bone versus immune system. *Nature.* 2000; 408(6812), 535-536. doi: 10.1038/35046196
- Asagiri M., & Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone.* 2007;40(2), 251-264. Doi:10.1016/j.bone.2006.09.023
- Athanasiadis G., Malouf J., Hernandez-Sosa N. et al. Linkage and association analyses using families identified a locus affecting an osteoporosis-related trait. *Bone.* 2014; 60, 98-103. doi: 10.1016/j.bone.2013.12.010
- Baron, R. & Kneissel, M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat. Med.* 19, 179–192 (2013).
- Baker J., Ostergaard M., George M. et al. Greater body mass independently predicts less radiographic progression on X-ray and MRI over 1–2 years. *Ann Rheum Dis.* 2014; 73(11), 1923-1928. Doi:10.1136/annrheumdis-2014-205544
- Balemans W., Ebeling M., Patel N. et al. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet.* 2001; 10(5), 537-543. Doi:10.1093/hmg/10.5.537
- Balemans W., Van Hul W. (2007). The genetics of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 in bone: a story of extremes. *Endocrinology* 148 2622–2629. 10.1210/en.2006-1352
- Barra L., Scinocca M., Saunders S. et al. Anti-Citrullinated protein antibodies in unaffected first-degree relatives of rheumatoid arthritis Patients. *Arthritis Rheum.* 2013; 65(6), 1439-1447. doi: 10.1002/art.37911

- Bautista-Molano, W., Fernández-Avila, D., Jiménez, R., Cardozo, R., Marín, A., Soler, M. del, Gómez, O., & Ruiz, O. (2016). Epidemiological profile of Colombian patients with rheumatoid arthritis in a specialized care clinic. *Reumatología Clínica (English Edition)*, 12(6), 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.reumae.2016.07.002>
- Berglin E., Padyukov L., Sundin U. et al. A combination of autoantibodies to cyclic citrullinated peptide (CCP) and HLA-DRB1 locus antigens is strongly associated with future onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004; 6(4), R303. doi: 10.1186/ar1187
- Bos W.H, G.J. Wolbink, M. Boers, G.J. Tjhuis, N. de Vries, I.E. van der HorstBruinsma, et al., Arthritis development in patients with arthralgia is strongly associated with anti-citrullinated protein antibody status: a prospective cohort study, *Ann Rheum Dis* 69 (2010) 490–494, <https://doi.org/10.1136/ard.2008.105759>.
- Boyden L., Mao J., Belsky J. et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med.* 2002; 346(20), 1513-1521. doi: 10.1056/nejmoa013444
- Caceres A, Basagaña X, Gonzalez JR. Multiple correspondence discriminant analysis: An application to detect stratification in copy number variation. *Statistics in Medicine* (2010) 29:3284–3293. doi: 10.1002/sim.3890).
- Cardona A, Acevedo M. Bello JM. et al. Association of Dickkopf-1 polymorphisms with radiological damage and periodontal disease in patients with early rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol.* 2020; 26(7)187-194 doi: 10.1097/RHU.0000000000001391
- Chaparro JA, Bautista W, Bello JM, et al. Association of adipokines with rheumatic disease activity indexes and periodontal disease in patients with early rheumatoid arthritis and their first-degree relatives. *Int J Rheum Dis.* 2019; 22(11):1990-2000. doi: 10.1111/1756-185X.13724.
- Chen X., Baum W., Dwyer D. et al. Sclerostin inhibition reverses systemic, periarticular and local bone loss in arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2013, 72(10), 1732-1736. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203345
- Cheng-gui Miao, Ying-ying Yang, Xu He, Xiao-feng Li, Cheng Huang, Yan Huang, Lei Zhang, Xiong-Wen Lv, Yong Jin, Jun Li, Wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling, *Cellular Signalling* (2013), doi: 10.1016/j.cellsig.2013.04.00
- Chila L, Rodríguez L, Bautista W, et al. Anti-carbamylated protein and peptide antibodies as potential inflammatory joint biomarkers in the relatives of rheumatoid arthritis patients. *Int. J. Rheum. Dis.* 2020; 23, 1698– 1706. Doi:10.1111/1756-185X.13977
- Chung I., Ketharnathan S., Thiruvengadam M. et al. Rheumatoid Arthritis: The Stride from Research to Clinical Practice. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(6), 900. doi:10.3390/ijms17060900
- Colditz, J. et al. (2020) “Contributions of dickkopf-1 to obesity-induced bone loss and Marrow adiposity,” *JBMR Plus*, 4(6). Available at: <https://doi.org/10.1002/jbm4.10364>.

- Corrado A, Maruotti N, Cantatore FP. Osteoblast Role in Rheumatic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2017 Jun 15;18(6):1272. doi: 10.3390/ijms18061272. PMID: 28617323; PMCID: PMC5486094.
- Costello, R.E., Humphreys, J.H., Sergeant, J.C. et al. Symptoms in first-degree relatives of patients with rheumatoid arthritis: evaluation of cross-sectional data from the symptoms in persons at risk of rheumatoid arthritis (SPARRA) questionnaire in the PRe-clinical EVALuation of Novel Targets in RA (PREVeNT-RA) Cohort. *Arthritis Res Ther* 23, 210 (2021).
- Daniele G, Winnier D, Mari A, Bruder J, Fourcaudot M, Pengou Z, Tripathy D, Jenkinson C, Folli F. Sclerostin and insulin resistance in prediabetes: evidence of a cross talk between bone and glucose metabolism. *Diabetes Care* 2015;38:1509-1517.
- de Resende M., Rodrigues C., Gomes, K. et al. High prevalence of obesity in rheumatoid arthritis patients: association with disease activity, hypertension, dyslipidemia and diabetes, a multi-center study. *Adv. Rheumatol.* 2019; 59(1). Doi:10.1186/s42358-019-0089-1
- De Rooy D., Van der Linden M., Knevel R. et al. Predicting arthritis outcomes-what can be learned from the Leiden Early Arthritis Clinic? *Rheumatology.* 2010; 50(1), 93-100. doi:10.1093/rheumatology/keq230
- De Rooy D., Yeremenko N., Wilson A. et al. Genetic studies on components of the Wnt signalling pathway and the severity of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2013; 72(5), 769-775. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-202184
- De Rycke L., Peene I., Hoffman I., et al. Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. *Ann Rheum Dis.* 2004; 63(12), 1587-1593. doi:10.1136/ard.2003.017574
- Diarra D., Stolina M., Polzer K et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat. Med.* 2007; 13(2), 156-163. doi: 10.1038/nm1538
- Díaz J., Dávila F., Quintana G. et al. (2016). Rheumatoid arthritis prevalence in Colombia: An approach based on burden of disease study during 2005. *Rev. Colomb. Reumatol.* 2016; 23(1), 11-16. doi: 10.1016/j.rcreue.2016.04.002
- Eke P., Page R., Wei L. et al. Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis. *J Periodontol.* 2012; 83(12), 1449-1454. doi:10.1902/jop.2012.110664
- Emery P., The Roche Rheumatology Prize Lecture. The optimal management of early rheumatoid disease: The key to preventing disability. *Rheumatology.* 1994, 33(8), 765–768, doi:10.1093/rheumatology/33.8.765
- Firestein G. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 2003; 423(6937), 356-361. doi:10.1038/nature01661
- Frisell T., Holmqvist M., Källberg H. et al. Familial risks and heritability of rheumatoid arthritis: Role of rheumatoid factor/Anti-Citrullinated protein antibody status, number and Type of affected relatives, sex, and age. *Arthritis Rheum.* 2013; 65(11), 2773-2782. doi:10.1002/art.38097
- Frommer K., Schäffler A., Rehart S. Free fatty acids: potential proinflammatory mediators in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 2015; 74(1), 303-310. doi:10.1136/annrheumdis-2013-203755



- García A., Segami M., Mora C. et al. Obesity is independently associated with impaired quality of life in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 2007; 26(11), 1831-1835. <https://doi.org/10.1007/s10067-007-0583-4>
- Garnero P., Tabassi N., Voorzanger N. et al. Circulating Dickkopf-1 and radiological progression in patients with early rheumatoid arthritis treated with Etanercept. *J Rheumatol.* 2008; 35(12), 2313-2315. doi: 10.3899/jrheum.080356
- Gerlag D., Raza K., van Baarsen L. et al. EULAR recommendations for terminology and research in individuals at risk of rheumatoid arthritis: report from the study group for risk factors for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71(5), 638-641. doi:10.1136/annrheumdis-2011-200990
- Gharbia O., El-Bahnasawy A., Okasha A. et al. Impact of obesity on rheumatoid arthritis: Relation with disease activity, joint damage, functional impairment and response to therapy. *Int. J. Clin. Rheumatol.* 2018; 13(6). Doi:10.4172/1758-4272.1000209
- Gómez C., Martín I., Loza E. et al. Effect of Osteoprotegerin and Dickkopf-Related Protein 1 on radiological progression in tightly controlled rheumatoid arthritis. *Plos One.* 2016; 11(12), e0166691. doi: 10.1371/journal.pone.0166691
- Gong Y., Slee R., Fukai N. et al. LDL Receptor-Related Protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell.* 2001; 107(4), 513-523. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00571-2
- Gonzalez A., Icen M., Kremers H. et al. (2008). Mortality Trends in Rheumatoid Arthritis: The role of Rheumatoid Factor. *J Rheumatol.* 2008 35(6), 1009-1014.
- Glass, D.A., II; Bialek, P.; Ahn, J.D.; Starbuck, M.; Patel, M.S.; Clevers, H.; Taketo, M.M.; Long, F.; McMahon, A.P.; Lang, R.A.; et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev. Cell* 2005, 8, 751–764.
- Gregersen P., Silver J., Winchester R. et al. The shared epitope hypothesis. an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1987; 30(11), 1205-1213. doi: 10.1002/art.1780301102
- Hardy R, Juarez M, Naylor A, et al. Synovial DKK-1 expression is regulated by local glucocorticoid metabolism in inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14:R226.
- Harre U., y Schett, G. Cellular and molecular pathways of structural damage in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol.* 2017; 39(4), 355-363. doi: 10.1007/s00281-017-0634-0
- Harre U., Georgess D., Bang H. et al. (2012). Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J. Clin. Investig.* 2012; 122(5), 1791-1802. doi: 10.1172/jci60975
- Heiland G., Zwerina K., Baum W. et al. Neutralisation of Dkk-1 protects from systemic bone loss during inflammation and reduces sclerostin expression. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69(12), 2152-2159. doi: 10.1136/ard.2010.132852
- Heredia A.M., Lafaurie G., Bautista W. et al. Predictive factors related to the progression of periodontal disease in patients with early rheumatoid arthritis: a cohort study. *BMC Oral Health.* 2019; 19, 240. Doi:10.1186/s12903-019-0939-6

- Johansson L, Sherina N, Kharlamova N, et al. Concentration of antibodies against *Porphyromonas gingivalis* is increased before the onset of symptoms of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2016;18:201.
- Jorgensen K., Wiik A., Pedersen M. et al. Cytokines, autoantibodies and viral antibodies in pre-morbid and postdiagnostic sera from patients with rheumatoid arthritis: case-control study nested in a cohort of Norwegian blood donors. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67(6), 860-866. doi:10.1136/ard.2007.073825
- Juarez M., McGettrick H., Scheel D. et al. DKK1 expression by synovial fibroblasts in very early rheumatoid arthritis associates with lymphocyte adhesion in an in vitro flow co-culture system. *Arthritis Res. Ther.* 2016; 18(1). doi: 10.1186/s13075-016-0915-3
- Kellgren J., Lawrence J. Radiological Assessment of Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1957; 16(4), 485-493. doi: 10.1136/ard.16.4.485
- Kim J., Liu X., Wang J. et al. Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 2013 5(1), 13-31. doi:10.1177/1759720x12466608
- Kinne R., Stuhlmüller B., & Burmester G. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Res. Ther.* 2007; 9(6), 224. Doi:10.1186/ar2333
- Klareskog L., Stolt P., Lundberg K. et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: Smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.* 2005; 54(1), 38-46. doi: 10.1002/art.21575
- Knevel R., Gröndal G., Huizinga T. et al. Genetic predisposition of the severity of joint destruction in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Ann Rheum Dis.* 2012; 71(5), 707-709. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200627
- Kochi, Y.; Thabet, M.M.; Suzuki, A.; Okada, Y.; Daha, N.A.; Toes, R.E.; Huizinga, T.W.; Myouzen, K.; Kubo, M.; Yamada, R.; et al. PADI4 polymorphism predisposes male smokers to rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2011, 70, 512–515.
- Koppejan H., Trouw L., Sokolove J. et al. Role of Anti-Carbamylated protein antibodies compared to Anti-citrullinated protein antibodies in indigenous North Americans with Rheumatoid Arthritis, their first-degree relatives, and healthy controls. *Arthritis Rheum.* 2016; 68(9), 2090-2098. doi: 10.1002/art.39664
- Krishnamurthy A., Joshua V., Haj Hensvold A. et al. Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss. *Ann Rheum Dis.* 2015; 75(4), 721-729. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-208093
- Kurkó J., Besenyei T., Laki J. et al. Genetics of Rheumatoid Arthritis — A Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2013; 45(2), 170-179. doi: 10.1007/s12016-012-8346-7
- Langlely G., & Sheppard, H. The visual analogue scale: Its use in pain measurement. *Rheumatol. Int.* 1985; 5(4), 145-148. Doi:10.1007/bf00541514
- Larsen A., Dale K., Eek M. et al. Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by standard reference films. *Acta Radiol Diagn.* 1977; 18(4), 481-491. doi:10.1177/028418517701800415
- Lewiecki, E. Role of sclerostin in bone and cartilage and its potential as a therapeutic target in bone diseases. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 2013; 6(2), 48-57. doi:10.1177/1759720x13510479

- Lim K-E, Bullock WA, Horan DJ, Williams BO, Warman ML, Robling AG. Co-deletion of *Irp5* and *Irp6* in the skeleton severely diminishes bone gain from sclerostin antibody administration. *Bone*. 2021;143: 115708.
- Liu Y., Long L., Wang S. et al. Circulating Dickkopf-1 and osteoprotegerin in patients with early and longstanding rheumatoid arthritis. *Chin J Traumatol*. 2010; 123(11), 1407–1412. doi: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.11.010
- Liu, J., Xiao, Q., Xiao, J. et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Sig Transduct Target Ther* 7, 3 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>
- Londoño J., Peláez I., Cuervo F. et al. Prevalencia de la enfermedad reumática en Colombia, según estrategia COPCORD-Asociación Colombiana de Reumatología. Estudio de prevalencia de enfermedad reumática en población colombiana mayor de 18 años. *Rev.Colomb.Reumatol*. 2018; 25(4), 245-256. Doi: 10.1016/j.rcreu.2018.08.003
- Ma B, Hottiger MO. Crosstalk between Wnt/ $\beta$ -catenin and NF- $\kappa$ B signaling pathway during inflammation. *Front Immunol*. 2016;7:378.
- MacGregor A., Snieder H., Rigby A. et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum*. 2000; 43(1), 30-37. doi:10.1002/1529-0131(200001)43:1<30::aid-anr5>3.0.co;2-b
- Machado J., Ruiz A., Medina D. et al. The epidemiology of rheumatoid arthritis in a cohort of Colombian patients. *Rev. Colomb. Reumatol*. 2015; 22(3), 148-152. doi:10.1016/j.rcreu.2015.05.006
- Machold K., Stamm T., Nell V. et al. Very recent onset rheumatoid arthritis: clinical and serological patient characteristics associated with radiographic progression over the first years of disease. *J. Rheumatol*. 2006; 46(2), 342-349. doi: 10.1093/rheumatology/kel237
- Maleki, F., Ovens, K., McQuillan, I. et al. Size matters: how sample size affects the reproducibility and specificity of gene set analysis. *Hum Genomics* 13 (Suppl 1), 42 (2019). <https://doi.org/10.1186/s40246-019-0226-2>
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G. et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *Nature* 417, 664–667 (2002). <https://doi.org/10.1038/nature756>
- Maruotti, N.; Corrado, A.; Neve, A.; Cantatore, F.P. Systemic effects of Wnt signaling. *J. Cell. Physiol*. 2013, 228, 1428–1432. [CrossRef] [PubMed]
- Mathew A., Ravindran V. Infections and arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol*. 2014; 28(6), 935-959. DOI:10.1016/j.berh.2015.04.009
- McInnes I., Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*. 2011; 365(23), 2205-2219. doi: 10.1056/nejmra1004965
- Meyer M, Sellam J, Fellahi S, et al. Serum level of adiponectin is a surrogate independent biomarker of radiographic disease progression in early rheumatoid arthritis: results from the ESPOIR cohort. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(6):R210. doi: 10.1186/ar4404
- Miao C., Yang Y., He X. et al. Wnt signaling pathway in rheumatoid arthritis, with special emphasis on the different roles in synovial inflammation and bone remodeling. *Cell. Signal*. 2013; 25(10), 2069-2078. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.04.002

- Miceli, C., Taylor K., Nititham J. et al. Genetic contribution of DKK-1 polymorphisms to RA structural severity and DKK-1 level of expression. *Ann Rheum Dis.* 2015; 74(7), 1480-1481. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-206530
- Napimoga M., Nametala C., da Silva F. et al. Involvement of the Wnt- $\beta$ -catenin signalling antagonists, sclerostin and dickkopf-related protein 1, in chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2014; 41(6), 550-557. doi: 10.1111/jcpe.12245
- Naranjo A., Sokka T., Descalzo M. et al. Cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: results from the QUEST-RA study. *Arthritis Res. Ther.* 2008; 10(2), R30. Doi:10.1186/ar2383
- Okada Y., Wu D., Trynka G. et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature.* 2013; 506(7488), 376-381. doi: 10.1038/nature12873
- Ossa H, Aquino J, Pereira R, et al. Outlining the Ancestry Landscape of Colombian Admixed Populations. *Plos One.* 2016;11(10):e0164414. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164414>
- Ospina M., Romero M.C. et al. (2018). Frecuencias alélicas y genotípicas de polimorfismos de genes asociados a la vía de Wnt en individuos sistémicamente sanos y su asociación con variables clínicas periodontales. In PROOF
- Papapanou P., Sanz M., Buduneli N. et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J. Periodontol.* 2018; 89, S173-S182. doi: 10.1002/jper.17-0721
- Pinzone J. J., Hall B. M., Thudi N. K., Vonau M., Qiang Y. W., Rosol T. J., et al. (2009). The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. *Blood* 113 517–525. 10.1182/blood-2008-03-145169
- PETERS E., BOUDIN E., VAN HUL W. et al. Wnt signaling: A win for bone. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 473(2), 112-116. doi: 10.1016/j.abb.2008.03.006
- Polzer K, Diarra D, Zwerina J, Schett G. Inflammation and destruction of the joint sethe Wnt pathway. *Jt Bone Spine* 2008;75:105e7
- Prevoo M., VanT Hof M., & Kuper H. et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1995; 38(1), 44-48.
- Qu, Y., Olsen, J., Yuan, X. et al. Small molecule promotes  $\beta$ -catenin citrullination and inhibits Wnt signaling in cancer. *Nat Chem Biol* 14, 94–101 (2018). <https://doi.org/10.1038/nchembio.2510>
- Rantapää-Dahlqvist, S. et al. (2003) "Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IGA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis," *Arthritis & Rheumatism*, 48(10), pp. 2741–2749. Available at: <https://doi.org/10.1002/art.11223>.
- Ray S, Khassawna TE, Sommer U, et al. Differences in expression of Wnt antagonist DKK-1 in healthy versus pathological bone samples. *J Microsc.* 2017;265:111–120.
- Raychaudhuri S., Sandor C., Stahl E. et al. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* 2012; 44(3), 291-296. doi: 10.1038/ng.1076
- Regueiro C., Ortiz A., & Boveda, M. Association of high titers of anti-carbamylated protein antibodies with decreased bone mineral density in early

- arthritis patients. PLOS ONE. 2018; 13(8), e0202583. doi: 10.1371/journal.pone.0202583
- Rodríguez J, Lafaurie GI, Bautista W et al. Adipokines and periodontal markers as risk indicators of early rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Clin Oral Investig*. 2020;1. doi: 10.1007/s00784-020-03469-0.
  - Rojas A, Diaz FJ, Calvo E., et al. Familial disease, the HLA-DRB1 shared epitope and anti-CCP antibodies influence time at appearance of substantial joint damage in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. 2009;32(1):64-9. doi: 10.1016/j.jaut.2008.11.004.
  - Royo JL. Hardy Weinberg Equilibrium Disturbances in Case-Control Studies Lead to Non-Conclusive Results. *Cell J*. 2021 Jan;22(4):572-574. doi: 10.22074/cellj.2021.7195. Epub 2020 Apr 22. PMID: 32347052; PMCID: PMC7211273.
  - Ruiz-Esquide, V., & Sanmartí, R. (2012). Tabaco y Otros Factores Ambientales en la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica*, 8(6), 342–350. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2012.02.011>
  - Sahoo R., Dhakad U., Goel A. et al. Serum sclerostin levels in rheumatoid arthritis and correlation with disease activity and bone mineral density. *Indian J. Rheumatol*. 2016; 14(1), 28. doi: 10.4103/injr.injr\_113\_18
  - Santos AM, Saldarriaga EL, Giraldo R., et al. Dickkopf 1 protein circulating levels as a possible biomarker of functional disability and chronic damage in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2018; 37(3):795-801. doi: 10.1007/s10067-017-3957-2.
  - Saarinen A, Saukkonen T, Kivela T, Lahtinen U, Laine C, Somer M, Toiviainen-Salo S, Cole WG, Lehesjoki AE, Makitie O. Low density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) mutations and osteoporosis, impaired glucose metabolism and hypercholesterolaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010;72:481-488.
  - Schulze J., Seitz S., Saito H., Schneebauer M., Marshall R. P., Baranowsky A., et al. (2010). Negative regulation of bone formation by the transmembrane Wnt antagonist Kremen-2. *PLoS One* 5:e10309. 10.1371/journal.pone.0010309
  - Seror R., Boudaoud S., Pavy S. et al. Increased Dickkopf-1 in Recent-onset Rheumatoid Arthritis is a New Biomarker of Structural Severity. Data from the ESPOIR Cohort. *Sci. Rep*. 2016; 6(1). doi: 10.1038/srep18421
  - Sharp J., Lidsky M., Collins L. et al. Methods of scoring the progression of radiologic changes in rheumatoid arthritis. Correlation of radiologic, clinical and laboratory abnormalities. *Arthritis Rheum*. 1971; 14(6), 706-720. doi: 10.1002/art.1780140605
  - Shaw A., & Gravallesse E. Mediators of inflammation and bone remodeling in rheumatic disease. *Semin. Cell Dev. Biol*. 2016; 49, 2-10. doi: 10.1016/j.semcd.2015.10.013
  - Shi J., Knevel R., Suwannalai P. et al. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108(42), 17372-17377. doi: 10.1073/pnas.1114465108
  - Shi J., Ying H., Du J. et al. Serum Sclerostin Levels in Patients with Ankylosing Spondylitis and Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioMed Res. Int.* 2017; 1-7. doi: 10.1155/2017/9295313

- Shi J., L.A. van de Stadt, E.W. Levarht, T.W. Huizinga, R.E. Toes, L.A. Trouw, et al., Anti-carbamylated protein antibodies are present in arthralgia patients and predict the development of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum* 65 (2013) 911–915,
- Shimizu T., Cruz A., Tanaka M. et al. Structural Changes over a short period are associated with functional assessments in Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* 2019; 46(7), 676-684. doi: 10.3899/jrheum.180496
- Singh, A., Gupta, M. K., & Mishra, S. P. (2019). Study of correlation of level of expression of Wnt signaling pathway inhibitors sclerostin and dickkopf-1 with disease activity and severity in rheumatoid arthritis patients. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 13(1), 22–27. <https://doi.org/10.5582/ddt.2019.01011>
- Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB. Inflammation and Cancer *Ann Afr Med.* 2019;18:121–6. [https://doi.org/10.4103/aam.aam\\_56\\_18](https://doi.org/10.4103/aam.aam_56_18)
- Singh, A. N. U. P. (2019). Correlation of level of expression of Wnt signaling pathway inhibitor dickkopf-1 with disease activity in elderly patients of rheumatoid arthritis: A Cross Sectional Study. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(1), 348–350. <https://doi.org/10.22270/jddt.v9i1.2343>
- Smolen J., Breedveld F., Schiff M. et al. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology*. 2003; 42(2), 244-257. Doi:10.1093/rheumatology/keg072
- Sparks J., Iversen M., Miller R. et al. Personalized Risk Estimator for Rheumatoid Arthritis (PRE-RA) Family Study: Rationale and design for a randomized controlled trial evaluating rheumatoid arthritis risk education to first-degree relatives. *Contemp. Clin. Trials*. 2014; 39(1), 145-157. doi: 10.1016/j.cct.2014.08.007
- Sparks, J. A., Chang, S.-C., Deane, K. D., et al. (2016). Associations of smoking and age with inflammatory joint signs among unaffected first-degree relatives of rheumatoid arthritis patients: Results from studies of the etiology of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, 68(8), 1828–1838. <https://doi.org/10.1002/art.39630>
- Staehling K., Proll S., Paepfer, B. et al. A 52-kb deletion in the SOST-MEOX1 intergenic region on 17q12-q21 is associated with van Buchem disease in the Dutch population. *Am. J. Med. Genet.* 2002; 110(2), 144-152. doi: 10.1002/ajmg.10401
- Stavropoulos A., Metsios G., Panoulas V. et al. Underweight and obese states both associate with worse disease activity and physical function in patients with established rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 2008; 28(4), 439-444. Doi:10.1007/s10067-008-1073-z
- Sugiyama D., Nishimura K., Tamaki K. et al. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis.* 2009; 69(01), 70-81. doi: 10.1136/ard.2008.096487
- Taneja, V. Arthritis susceptibility and the gut microbiome. *FEBS Letters*. 2014; 588(22), 4244-4249. Doi:10.1016/j.febslet.2014.05.034
- Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J. Mol. Med.* 2005; 83(3), 170-179. doi: 10.1007/s00109-004-0612-6

- Taylor S, Scott R, Kurtz R, et al. A Practical Guide to High Resolution Melt Analysis Genotyping. Hercules, CA: Bio-Rad Laboratories, Inc. 2012
- Terpos E., Fragiadaki K., Konsta M. et al. Early effects of IL-6 receptor inhibition on bone homeostasis: a pilot study in women with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* . 2011; 29, 921-925.
- Theologis, T., Efstathopoulos, N., Nikolaou, V., Charikopoulos, I., Papapavlos, I., Kokkoris, P., Papatheodorou, A., Nasiri-Ansari, N., & Kassi, E. (2017). Association between serum and synovial fluid dickkopf-1 levels with radiographic severity in primary knee osteoarthritis patients. *Clinical Rheumatology*, 36(8), 1865–1872.
- The 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467, 1061–1073 (2010). <https://doi.org/10.1038/nature09534>
- Tilg H., & Moschen, A. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6(10), 772-783. doi: 10.1038/nri1937
- Udalova I., Mantovani A., & Feldmann, M. Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* 2016; 12(8), 472-485. Doi:10.1038/nrrheum.2016.91
- Unriza-Puin S, Bautista-Molano W, Lafaurie G, Valle-Oñate RR, Chalem P, Chila L, Bello JM, Romero Sanchez C. [abstract]. *Arthritis Rheumatol.* 2016; 68 (suppl 10). <https://acrabstracts.org/abstract/comparison-of-body-mass-index-anti-citrullinated-peptides-antibodies-status-and-periodontal-condition-in-first-degree-relatives-individuals-to-rheumatoid-arthritis/>. Accessed November 6, 2022.
- Van de Sande M., & Baeten, D. Immunopathology of synovitis: from histology to molecular pathways. *Rheumatology*. 2015; 55(4), 599-606. doi: 10.1093/rheumatology/kev330
- Van Der Heijde D., Van P., Gribnau F. et al. Effects of hydroxychloroquine and sulphasalazine on progression of joint damage in rheumatoid arthritis. *The Lancet*, 1989; 333(8646), 1036-1038. doi: 10.1016/s0140-6736(89)92442-2
- Van der Heijde D., Dankert T., Nieman F. et al. Reliability and sensitivity to change of a simplification of the Sharp/van der Heijde radiological assessment in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 1999; 38(10), 941-947. Doi:10.1093/rheumatology/38.10.941
- Van Lierop A., Hamdy N., Hamersma H. et al (2011). Patients with sclerosteosis and disease carriers: Human models of the effect of sclerostin on bone turnover. *J Bone Miner Res.* 2011; 26(12), 2804-2811. doi: 10.1002/jbmr.474
- Van L., Voskuyl A., Boers M. et al. Baseline RANKL: OPG ratio and markers of bone and cartilage degradation predict annual radiological progression over 11 years in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010; 69(9), 1623-1628. doi: 10.1136/ard.2009.121764
- Viatte S., Barton, A. Genetics of rheumatoid arthritis susceptibility, severity, and treatment response. *Semin Immunopathol.* 2017; 39(4), 395-408. doi: 10.1007/s00281-017-0630-4
- Vidal C., Barnetche T., Morel J. Association of body mass index categories with disease activity and radiographic joint damage in rheumatoid arthritis: A

- systematic review and metaanalysis. *J. Rheumatol.* 2015; 42(12), 2261-2269. Doi:10.3899/jrheum.150224
- Vis M., Havaardsholm E., Haugeberg G. et al. Evaluation of bone mineral density, bone metabolism, osteoprotegerin and receptor activator of the NF B ligand serum levels during treatment with infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65(11), 1495-1499. doi: 10.1136/ard.2005.044198
  - Vlaicu S., Tatomir A., Boodhoo D. et al. The role of complement system in adipose tissue-related inflammation. *Immunol. Res.* 2016; 64(3), 653-664. Doi:10.1007/s12026-015-8783-5
  - Walsh N., & Gravallesse E. Bone remodeling in rheumatic disease: a question of balance. *Immunol. Rev.* 2010; 233(1), 301-312. doi: 10.1111/j.0105-2896.2009.00857.x
  - Walsh N., Reinwald S., Manning C. et al. Osteoblast function is compromised at sites of focal bone erosion in inflammatory arthritis. *Bone.* 2009; 44, S158. doi:10.1016/j.bone.2009.01.349
  - Wang S., Liu Y., Ye H. et al. Circulating Dickkopf-1 Is Correlated with Bone Erosion and Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* 2011; 38(5), 821-827. doi:10.3899/jrheum.100089
  - Wang Z., Nicholls S., & Rodriguez, E. et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. *Nat Med.* 2007; 13(10), 1176-1184. doi:10.1038/nm1637
  - Wegner N., Wait R., Sroka A. et al. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and  $\alpha$ -enolase: Implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(9), 2662-2672. doi: 10.1002/art.27552
  - Wehmeyer C., Stratis A., Pap T. et al . The Role of the WNT inhibitor sclerostin in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010, 69(Suppl 2), A21-A21. doi: 10.1136/ard.2010.129593n
  - Westra, H.J.; Martínez-Bonet, M.; Onengut-Gumuscu, S.; Lee, A.; Luo, Y.; Teslovich, N.; Worthington, J.; Martin, J.; Huizinga, T.; Klareskog, L.; et al. Fine-mapping and functional studies highlight potential causal variants for rheumatoid arthritis and type 1 diabetes. *Nat. Genet.* 2018, 50, 1366–1374.
  - Wodarz A., & Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1998; 14(1), 59-88. doi: 10.1146/annurev.cellbio.14.1.59
  - Xiao C., Pan Y., Guo X., et al. Expression of  $\beta$ -catenin in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Scand J Rheumatol.* 2010; 40(1), 26-33. doi: 10.3109/03009742.2010.486767
  - Yang X., Chang Y., & Wei, W. (2020). Emerging role of targeting macrophages in rheumatoid arthritis: Focus on polarization, metabolism and apoptosis. *Cell Prolif.* 2020; 53(7). Doi:10.1111/cpr.12854
  - Yarwood A., Eyre S., Worthington J. et al. Genetic susceptibility to rheumatoid arthritis and its implications for novel drug discovery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2016;11(8), 805-813. doi:10.1080/17460441.2016.1195366
  - Yavropoulou MP, Yovos JG. The role of the Wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation. *Hormones (Athens).* 2007 Oct-Dec;6(4):279-94. doi: 10.14310/horm.2002.1111024. PMID: 18055419.



- Zerbini C., Clark P., Mendez L. et al. Biologic therapies and bone loss in rheumatoid arthritis. *Osteoporos. Int.* 2016; 28(2), 429-446. doi: 10.1007/s00198-016-3769-2