



**Efecto *in vitro* del material particulado en células mononucleares de sangre periférica  
provenientes de pacientes con artritis reumatoide.**

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado

Bogotá, septiembre del 2021



**Efecto *in vitro* del material particulado en células mononucleares de sangre periférica  
provenientes de pacientes con artritis reumatoide.**

**Estudiante:** Daniel Felipe Galeano Sánchez

**Asesor externo**

Heily Carolina Ramírez Santana Ph.D

**Asesor interno**

Claudia Andrea Cruz Baquero Ph.D

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico  
Trabajo de grado

Bogotá, septiembre del 2021



**Efecto *in vitro* del material particulado en células mononucleares de sangre periférica  
provenientes de pacientes con artritis reumatoide.**

**APROBADA**

---

**JURADOS**

---

---

**ASESORES**

**Asesor externo:** Heily Carolina Ramírez Santana Ph.D  
Centro de Estudio de Enfermedades Autoinmunes – CREA

**Asesor interno:** Claudia Andrea Cruz Baquero Ph.D  
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca - UCM

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Facultad de Ciencias de la Salud  
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico

Trabajo de grado  
Bogotá, septiembre del 2021

**Dedicatoria**

*Este trabajo es dedicado principalmente a Dios por brindarme la sabiduría, la salud y el conocimiento para llevar a cabo y concluir exitosamente esta investigación para optar por mi título profesional superando todas las pruebas y obstáculos que se presentaron en el camino.*

*A mi madre Myriam Sánchez, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño, entendimiento, amor y apoyo incondicional, a mi padre Jairo Galeano por su nobleza y paciencia para estar en todo momento y finalmente, a mi hermano Sergio Galeano por ayudarme, escucharme y aconsejarme siempre que lo necesité y de sobremanera por ser un gran ejemplo a seguir con múltiples cualidades y capacidades.*

*Les dedico este trabajo por creer en mí, además de estar presentes en los momentos más difíciles dándome todo el apoyo necesario, estando presentes en mis alegrías y desaciertos para siempre tener un soporte en las dificultades.*

*A todos, muchas gracias.*

## **Agradecimientos**

Principalmente agradezco a Dios, a mis padres y a mi hermano por compartir sus experiencias y conocimientos, además de apoyarme en cada decisión que tomé para avanzar en mi vida académica y como superación personal, por todas las enseñanzas y valores que forjaron en mí desde mi infancia y que en este momento son herramientas imprescindibles para llegar a esta etapa. Por otra parte, agradezco inmensamente a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por la academia de formación que brinda a cada uno de los estudiantes y genera grandes pilares del conocimiento, no sólo en el área de la salud sino en los valores que se requieren para ser un profesional íntegro en la sociedad.

Mis más sinceros agradecimientos a las doctoras Carolina Ramírez, Diana Monsalve y Yeny Acosta por despertar en mí la devoción y el interés hacia la inmunología y todo su campo de investigación, además de ser grandes ejemplos de inspiración, ya que sus valores y conocimientos son inconmensurables. También les agradezco por darme un excelente entrenamiento, seguimiento, apoyo y dedicación para lograr un buen trabajo.

Al Centro de Estudios de Enfermedades Autoinmunes (CREA) por ser el lugar que me acogió, proporcionándome todos los insumos, materiales e instalaciones necesarios y financiando todo el proceso investigativo para el desarrollo de este proyecto. A todas las personas que hacen parte del CREA por ofrecerme su apoyo y entrega en diferentes conceptos además de compartir sus múltiples conocimientos.

A la Fundación Instituto de Inmunología de Colombia (FIDIC) por ser una escuela que me formó en otras áreas de investigación y me forjó mucho valor, paciencia y disciplina, especialmente al grupo funcional Receptor-Ligando y sus respectivos investigadores que fueron fundamentales para culminar este gran proceso.

A la doctora Claudia Cruz por asesorarme y estar pendiente de mi progreso en el trabajo y finalmente a mis compañeros y amigos que estuvieron allí con palabras y vibras positivas que prometían un logro más en mi vida personal y profesional.

A todos y cada uno de ustedes muchas gracias.

## **Contenido**

Resumen	8
Introducción	10
1. Antecedentes	11
2. Marco teórico	17
2.1 Bases teóricas	17
2.1.1 Vías respiratorias y Material particulado (MP)	17
2.1.2 Material particulado e inflamación	19
2.1.3 Estrés oxidativo	20
2.1.4 Inflamación y Enfermedades autoinmunes (EAI)	22
2.1.5 Artritis Reumatoide	23
3. Diseño Metodológico	23
3.1 Pregunta problema	23
3.2 Objetivos	24
3.2.1 Objetivo general	24
3.2.2 Objetivos específicos	24
3.3 Justificación	24
3.4 Marco conceptual	25
3.5 Marco legal	25
3.6 Normatividad ética	26
3.7 Tipo de investigación	27
3.8 Nivel, enfoque o alcance de la investigación	27
3.9 Población de estudio y muestra	27
3.9.1 Criterios de inclusión	28
3.9.2 Criterios de exclusión	28

3.10 Tamaño de la muestra	28
3.11 Procedimiento	29
3.11.1 Aislamiento PBMCs	29
3.11.2 Ensayo viabilidad celular con Azul de Tripán	30
3.11.3 Estimulación <i>in vitro</i> de PBMCs	30
3.11.4 Preparación Urban dust NIST SRM 1649b	33
3.11.6 Ensayo de citotoxicidad con concentraciones de 50µg/mL, 10µg/mL, 2,5 µg/mL y 1 µg/mL del contaminante	35
3.11.7 Ensayos de viabilidad por citometría de flujo con concentraciones de 50µg/mL, 10µg/mL, 2,5 µg/mL y 1 µg/mL del contaminante	35
3.11.8 Western blot para estudios de vías de señalización	35
3.11.9 Determinación de citoquinas por Cytometric Bead Array (CBA)	38
4. Resultados	39
4.1 Estimulación <i>in vitro</i> de PBMCs con PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) + Ionomicina de controles	39
4.2 Estimulación <i>in vitro</i> con mitógeno (Perlas magnéticas CD3/CD28) y contaminante SRM1649B	41
4.3 Ensayo Citotoxicidad con MTT con concentraciones de 50µg/mL, 10µg/mL, 2,5 µg/mL y 1 µg/mL del contaminante	42
4.5 Western blot	47
4.6 Citoquinas	48
5. Discusión	54
6. Conclusiones	57
6.1 Referencias Bibliográficas	58
7. Anexos	64

**EFFECTO *IN VITRO* DEL MATERIAL PARTICULADO EN CÉLULAS  
MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA PROVENIENTES DE PACIENTES  
CON ARTRITIS REUMATOIDE**

**Resumen**

Las enfermedades autoinmunes (EAI) son un problema de salud pública no sólo porque su prevalencia va en ascenso sino por el impacto que genera en diferentes sectores tales como el sector económico, social y cultural además de ser la cuarta causa de discapacidad en el género femenino, siendo esta la población más susceptible a desarrollar EAIs en comparación con el género masculino. La etiología de las EAIs se desconoce ya que su desarrollo se atribuye a múltiples factores internos (genética del huésped, microbioma y la actividad hormonal) y externos (exposición ambiental, infecciones, entre otros) donde la suma de los mismos y su interacción se conoce como exposoma y es un punto clave para entender el comportamiento de las EAIs. Por otra parte, el aumento de la contaminación atmosférica ha generado diversos efectos negativos en la salud humana, convirtiéndose así en un determinante de salud, ya que existe una mayor asociación entre la aparición de enfermedades de origen inflamatorio y una exposición continua a los agentes contaminantes en especial el Ozono (O<sub>3</sub>) y al Material particulado (MP). Motivo por el cual este trabajo de investigación se centró en evaluar el efecto de una referencia estándar de material particulado (SRM1649b) en células mononucleares de sangre periférica provenientes de pacientes con artritis reumatoide (AR). El estudio se centró en identificar viabilidad, citotoxicidad celular, y respuesta celular a través de la medición de citoquinas.

**Palabras clave:** *Material particulado, artritis reumatoide, enfermedades autoinmunes, respuesta inflamatoria, contaminación atmosférica, citoquinas.*

### **Abstract**

Autoimmune diseases (AID) are a public health problem not only because their prevalence is continuously increasing, but also because of the impact it generates in different sectors such as the economic, social and cultural sector, as well as being the fourth cause of disability in the female gender. This population is more susceptible to developing AIDs compared to the male gender. The etiology of AIDs is unknown since its development is attributed to multiple internal (host genetics, microbiome and hormonal activity) and external factors (environmental exposure, infections, among others) that interact to constitute the exposome which is a key point to understanding the behavior of AIDs. On the other hand, the increase in air pollution has generated various negative effects on human health, thus becoming a health determinant since there is a great association between the appearance of diseases of inflammatory origin and the continuous exposure to pollutants, especially Ozone (O<sub>3</sub>) and Particulate Matter (PM). This research work focused on evaluating the effect of a standard reference of particulate material (SRM1649b) in peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis (RA), through the measurement of viability, cellular cytotoxicity, and cellular response by cytokines.

**Key words:** *Particulate matter, rheumatoid arthritis, autoimmune diseases, inflammatory response, air pollution, cytokines.*

## **Introducción**

La primera asociación que se tiene acerca del sistema inmune es la protección contra agentes externos posiblemente infecciosos, sin embargo, esta no es la única función que cumple dicho sistema, ya que su papel fundamental es mantener el equilibrio (1). Este equilibrio también implica una protección contra agentes propios que han desarrollado alguna clase de alteración, señalando la existencia de mecanismos de presentación y reconocimiento antigénico, además de un control y una regulación que permite discernir y tolerar lo propio; pero que al mismo tiempo pueda generar una respuesta contra lo extraño, condición que se entiende como tolerancia inmunológica (1,2).

Recientemente se ha demostrado que la tolerancia no es absoluta, y puede presentar deficiencias; esto se debe a la gran diversidad proteica proveniente de los agentes externos e internos que pueden inducir respuestas inmunes que no protegen, sino por el contrario pueden generar posibles procesos patogénicos y una actividad exacerbada del sistema inmune, desencadenando así respuestas contra lo propio, lo que se conoce como autoinmunidad (3).

No obstante, la autoinmunidad se compone de varios fenómenos fisiológicos los cuales pueden ser benéficos (presencia de autoanticuerpos naturales, respuesta contra células transformadas/malignas) o también generar alguna reacción patológica (respuesta contra un huésped sano), esta última es la que se relaciona más con el término de enfermedad autoinmune (EAI) (4).

Múltiples factores influyen en el desarrollo de las EAIs, entre ellos los factores internos como la genética del huésped, las hormonas y deficiencias inmunológicas, o los factores externos como la exposición ambiental, infecciones, medicamentos, vacunas, entre otros. (4,5). Las EAIs se caracterizan por ser órgano-específicas (Diabetes mellitus tipo 1, Enfermedad de graves, entre otras) o sistémicas (Lupus eritematoso sistémico, Artritis reumatoide (AR)) (4).

Las EAIs cada vez son más frecuentes, tienen una prevalencia del 5% a nivel mundial, de este 5% aproximadamente un 80% corresponde a mujeres, razón por la cual es considerada la cuarta causa de discapacidad en el género femenino. (6,7)

## **1. Antecedentes**

Las partículas suspendidas en el aire tienen diferentes composiciones y tamaños, lo que les permite su fluidez en el medio o su capacidad de moverse en él, su concentración en las zonas urbanas cada vez es más alta y su constitución es bastante variable, sus principales componentes son metales de transición, iones (sulfato, nitrato), compuestos orgánicos, radicales estables quinoideos de material carbonoso, minerales, gases reactivos y materiales de origen biológico (14); además pueden consistir de partículas sólidas o líquidas así como de componentes semivolátiles y se clasifican según su diámetro aerodinámico (AD) donde el rango puede variar entre 0.005 a 100  $\mu\text{m}$ .

Estudios experimentales categorizan las partículas suspendidas/material particulado (MP) según el diámetro aerodinámico en función de cómo se originan y dónde se almacenan en las vías respiratorias humanas:  $<10$ ,  $<2.5$  y  $<0.1$   $\mu\text{m}$  ( $\text{MP}_{10}$ ,  $\text{MP}_{2.5}$  y  $\text{MP}_{0.1}$ , respectivamente). El

material particulado con un diámetro superior a 10  $\mu\text{m}$  tiene una vida media de suspensión relativamente pequeña y se filtra en gran medida por la nariz y las vías respiratorias superiores. Los investigadores definen un diámetro entre 2.5 y 10  $\mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2.5-10}$ ) como "grueso", menos de 2.5  $\mu\text{m}$  como "fino" y menos de 0.1  $\mu\text{m}$  como partículas "ultrafinas" (15).

Se ha demostrado que el MP es uno de los estresores ambientales más comunes y ocasiona irritación, reclutamiento y activación de células inflamatorias en las vías respiratorias y el parénquima pulmonar. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS) producidas por la activación de estas células inflamatorias dañan proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en el pulmón (16). Los mecanismos de restauración deterioran macromoléculas modificadas, que finalmente pueden alcanzar la circulación sistémica de diferentes formas; dichas modificaciones, sus resultados de degradación y de oxidación, al igual que citocinas inflamatorias, lípidos bioactivos y sus productos de peroxidación pueden interactuar con células en tejidos distantes al pulmón y alterar tanto su fisiología como el metabolismo según sea la presencia de receptores y la accesibilidad del tejido.

Varias células inflamatorias que pueden fagocitar cumplen un papel muy importante en la primera respuesta contra agentes patógenos, debido a que pueden liberar grandes cantidades de moléculas altamente tóxicas tales como RONS que se derivan principalmente del superóxido ( $\text{O}_2$ ) y de la síntesis de óxido nítrico (NO). Existe evidencia de que células no inflamatorias como el epitelio de las vías respiratorias también pueden cumplir dicha función (17);

*Kelly y Fussell* (18) a partir de estudios epidemiológicos y toxicológicos exponen la capacidad de varios componentes específicos del MP inhalado para generar cambios metabólicos en los principales órganos del sistema respiratorio. Un ejemplo de ello es el aumento del estrés oxidativo en el pulmón, además de presentar correlaciones entre exposiciones ambientales y variantes fisiológicas, convirtiéndose en una hipótesis unificadora para explicar los efectos agudos y crónicos en vías respiratorias y las adversidades salubres observadas en poblaciones con mayor exposición a la contaminación atmosférica.

Se ha demostrado la activación de varios factores de transcripción por parte de RONS implicados en mecanismos de alteración de actividad celular. Entre los más importantes se encuentran: El *factor nuclear derivado de eritroides 2* (Nrf2), la *proteína de activación-1* (AP-1), el *factor nuclear-kappaB* (NF-kB) (potenciador de la cadena ligera NF-kappa de las células B activadas), y *HIF-1* (un factor de transcripción heterodimérico, factor *inducible por hipoxia-1*) (19). La mayoría de estos factores de transcripción están implicados en procesos de inflamación, apoptosis, proliferación, transformación y diferenciación celular y son activados por partículas en suspensión, humo de tabaco, fibras minerales que generan ROS y otras especies oxidantes reactivas.

En un estudio realizado por *Ling y colaboradores* (20) se expuso que el material particulado (MP<sub>10</sub>), los factores estresantes inhalados como el ozono (O<sub>3</sub>), el humo del cigarrillo y las células inflamatorias, son la principal fuente de RONS en el pulmón y se asocian al aumento de IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF y MCP-1 al igual que proteínas de fase aguda. Estos factores estarían involucrados directamente en la activación de otras células inflamatorias, la amplificación del daño oxidativo y a la exacerbación de la inflamación.

Investigaciones referentes al MP esclarecen que el material particulado grueso (MP<sub>10</sub>) inicialmente genera afección en los bronquios superiores y provoca inflamación pulmonar, mientras que las partículas que más tenían asociación a procesos inflamatorios sistémicos, eran las finas (MP<sub>2.5</sub>) debido a que se logran transferir a sangre a través de poros presentes en la barrera alveolar-sangre correlacionando la idea de la presencia de “Neumoproteínas sanguíneas”, así mismo, refutan la idea de la translocación exclusiva del <MP<sub>2.5</sub> causada por la fagocitosis de las células inflamatorias (21).

*Calderón y colaboradores* (22) compararon niveles séricos de mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$ , prostaglandina (PG) E2, Proteína C Reactiva, IL-1 $\beta$  y endotelina-1 en niños sanos provenientes de dos ciudades de México con diferentes concentraciones de contaminación, y encontraron que los niños expuestos a concentraciones altas de MP<sub>2.5</sub> tenían un aumento significativo de estos mediadores y que posterior a ello desarrollaron inflamación sistémica teniendo un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (ECV),

aterosclerosis, accidente cerebrovascular y otros efectos sistémicos en el transcurso de la vida.

A partir de un estudio experimental utilizando ratones C57BL/6 se demostró que el asbesto como contaminante del aire se relacionaba directamente con la presencia y producción de autoanticuerpos tales como dsDNA y SSA / Ro, y que después de 26 semanas de exposición al compuesto mencionado se registraban depósitos de complejos inmunes en los riñones con presencia de glomerulonefritis (23); mecanismos claves en el desarrollo y progresión de varias enfermedades autoinmunes sistémicas.

*Bernatsky y colaboradores* (24) evaluaron epidemiológicamente la relación entre el  $MP_{2.5}$ , el dióxido de Nitrógeno ( $NO_2$ ) y la enfermedad reumática autoinmune sistémica (SARD) a escala local en Calgary, Alberta; encontrando una mayor incidencia de la enfermedad en mujeres con edad avanzada a causa del  $MP_{2.5}$  y en niños pequeños la presencia de Artritis idiopática juvenil (AIJ). Por otro parte el  $NO_2$  estaba asociado a AR pero no consideraron las estimaciones precisas para correlacionar con SARD por la heterogeneidad espacial que tiene la molécula al estar dispersa en el aire, además de una conexión de variaciones temporales y geográficas.

Corroborando los efectos negativos del MP en modelos biológicos se identificaron loci de susceptibilidad vinculados a disfunción inmune inducida por la inhalación de partículas de carbono asociadas a sulfatos en ratones endogámicos susceptibles C57BL / 6J y resistentes C3H / HeJ, las células diana fueron los macrófagos alveolares (MA) los cuales son esenciales debido a que representan un componente importante de defensa en la morbilidad respiratoria inducida por partículas en suspensión, encontrando que los genes dentro de estas regiones susceptibles integran aquellos implicados en inflamación ( $TNF\alpha$ , linfotoxina  $\alpha$ , proteasas de mastocitos, proteínas de choque térmico ) y estrés oxidativo (glutación peroxidasa) (25).

Una investigación vinculó la presencia de anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (ACPA) con componentes específicos de las emisiones atmosféricas industriales como el  $MP_{2.5}$  y el Dióxido de Azufre ( $SO_2$ ) expresando que había una relación elocuente de las exposiciones con la concurrencia de los anticuerpos, sin embargo, la positividad de los mismos se

entrelazaba con factores propios de la población de estudio como la edad, el sexo y la calidad de vida, además sugirieron que la presencia de ACPA solía estar acompañado de citoquinas proinflamatorias que contribuían en la patogénesis de AR (26)

*Deane y colaboradores* (27) compararon la presencia de ACPA en controles sanos y en pacientes seropositivos para AR encontrando la existencia de varios autoanticuerpos en pulmones y mucosas de las vías respiratorias detectados años o incluso décadas antes del desarrollo completo de la enfermedad, no obstante, informaron que con el tiempo en algunos controles aparentemente sanos la concentración aumentaba gradualmente hasta alcanzar un pico en el momento de inicio de la enfermedad durante el primer año de las manifestaciones clínicas y que finalmente un aumento concomitante de quimiocinas y citocinas en sangre y otros parámetros metabólicos alterados sugieren una patología inflamatoria sistémica subclínica en curso y gradualmente acelerada.

La fisiopatología de las EAIs puede estar mediada por linfocitos T autorreactivos y se ha evidenciado que la exposición al MP altera las poblaciones de los linfocitos T efectores en linfocitos T sanos y autorreactivos. En linfocitos T de donantes humanos sanos, las partículas de escape de diésel (DEP) de los motores de bajas emisiones disminuyeron la expresión de la cadena alfa del receptor de interleucina (IL)-2 (molécula CD25), un marcador de FOXP3+, en las células T CD4+, así como un perfil de expresión anormal de citoquinas Th1 e indujeron un bloqueo autofágico-lisosómico *in vitro* que se ha asociado con el progreso de las EAIs al desestabilizar el equilibrio homeostático de las diferentes poblaciones celulares de linfocitos T (28).

En un estudio experimental realizado por *Yun Ma y colaboradores* (29) demostraron una relación entre la expresión del receptor huérfano gamma t (ROR $\gamma$ t) y el receptor del ácido retinoico con la producción y liberación de IL-17A a partir de la interacción con MP<sub>2.5</sub> esto de una manera dependiente de la presencia de macrófagos, lo que implica una participación apreciable de LTh17 en respuestas inmunes mediadas por MP. Además, las células T CD4+ y CD8+ expuestas a las partículas finas no sólo elevaron significativamente los niveles de ARNm y de proteína coordinado con la producción de citocinas inflamatorias, sino que

también presentaron un potencial para inducir daño, sugiriendo nuevas vías en las que se ejerce daño en el tejido pulmonar.

Con el propósito de investigar los efectos del  $MP_{2.5}$  sobre las poblaciones celulares inflamatorias en el pulmón y la circulación sistémica, se midió la actividad celular en ratones C57B / L6 de tipo salvaje después de someterlos a inhalación crónica de  $PM_{2.5}$  durante 24 a 28 semanas, teniendo como resultado un aumento de células T  $CD4+$  y  $CD8+$  que expresan CXCR3 y de la infiltración en el tejido por parte de las mismas, al igual que una mayor activación de las células T efectoras (evidenciada por un aumento en  $CD4+$   $CD44+$   $CD62L-$  y  $CXCR3+$ ) en los pulmones, indicando que las partículas finas potencian una respuesta proinflamatoria donde se destacan linfocitos Th1 y Th17 (30).

*Williams y colaboradores* (31) evidenciaron que el factor de transcripción Nrf2 es un regulador clave que induce genes antioxidantes y de desintoxicación que protegen contra los efectos nocivos de ROS a partir de diferentes estímulos por MP, en este estudio compararon las respuestas de células dendríticas (CD) derivadas de médula ósea tanto de ratones CD1 (ICR) que carecían Nrf2 como de ratones Wild type (WT) que no tenían ninguna alteración, encontrando que en WT había una mejor expresión y desarrollo de CD80, CD86, MHC de clase II, subunidad catalítica de glutatión cisteína ligasa (GCLc), hemoxigenasa-1 (OH-1) pero una secreción disminuida de IL-18 y que en los ratones CD1(ICR) se secretan niveles constitutivamente mayores de IL-12p40, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  y VEGF, que podían acumular más  $H_2O_2$  y además lograban promover una respuesta mejorada de citoquinas pro-Th2.

El estrés oxidativo generado por RONS puede estimular a los MA y las células epiteliales de las vías respiratorias para que generen un perfil de citoquinas proinflamatorias, además de estimular las CD para que migren a los ganglios linfáticos locales, causar necrosis celular y apoptosis. En un estudio realizado tanto *in vivo* como *in vitro* en diferentes cepas de ratones probaron que estos procesos contribuyen a la liberación y activación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) que se acompañan de niveles elevados de IL-17 e IL-23 (32), estas activaciones tienen funciones claves en la patogénesis de enfermedades sistémicas inflamatorias.

*Zhao y colaboradores* (33) describieron el papel del tejido linfoide inducible asociado a bronquios (iBALT) que al activarse después de inflamación pulmonar local y sistémica por contaminación del aire podría estar involucrado en la patogénesis de varias EAIs ya que en estas está más desarrollado, su explicación se basó en que iBALT puede activar tanto a linfocitos T para liberar citoquinas proinflamatorias como a linfocitos B autorreactivos y diferenciarlos en células plasmáticas que posterior a ello tienen alto potencial de generar autoanticuerpos. Por tanto, iBALT puede ser un sitio de presentación de antígenos y juega un papel importante en la transformación de respuestas inmunes innatas en respuestas inmunes adaptativas en las EAIs.

La reacción entre ROS y RNS da como resultado la formación de peroxinitrito entre otros, el cual puede ayudar a la modificación estructural de autoantígenos generando nuevos epítomos potencialmente reactivos, *Dröge* (34) sustenta que los radicales centrados en biomoléculas al reaccionar con oxígeno se deterioran rápidamente por dos formas, por transferencia de electrones o por reacciones radical-radical que finalmente producen especies oxidadas las cuales forman aductos con otras biomoléculas, alterando su estructura y por tanto su función (receptor, mensajero, señal de compartimentación, enzima, transportador, etc.). Estas modificaciones son detectadas por la célula que induce una respuesta proinflamatoria y la exclusión de la molécula modificada bien sea por el proteosoma o enzimas como las glicosilasas y reductasas.

*Wu y colaboradores* (35) describen la fisiología del MP de diversas fuentes de combustión para causar daño en las células epiteliales de las vías respiratorias, monocitos y macrófagos que están acompañados de la liberación de TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , G-CSF, MIP 3 $\alpha$ , MCP-1 y MMP. Estos mediadores pueden reclutar más neutrófilos, monocitos y macrófagos al tejido dañado. Además, las células Th1 también presentes, secretan IFN- $\gamma$  y la IL-4 promueve la respuesta de Th2 las cuales pueden reclutar más células presentadoras de antígeno (CPA) y causar inflamación local. No obstante, mencionan que los niveles séricos de TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, PCR, E-selectina, ICAM-1 VCAM-1 son conocidos por causar no sólo lesión del endotelio vascular, sino que participan en inflamación sistémica y en el desarrollo de ECV.

Para analizar el efecto de las partículas de escape de diésel (DEP) en las EAI se utilizaron ratones hembra WT y C57BL / 6J a los cuales se les indujo Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) y posterior a ello tuvieron una exposición intranasal a distintas dosis de DEP provenientes de diferentes referencias de MP estándar como SRM1650b PM, SRM2975 MP observando un empeoramiento de la EAI asociado a una mayor participación de linfocitos T efectores; por un lado se observó que SRM1650b se relacionaba con una población elevada de linfocitos Th17, mientras que SRM2975 lo hacía con linfocitos Th1, los autores (36) exponen que estas variaciones podrían estar influenciadas por la biodisponibilidad de los componentes activos en las partículas de las referencias estándar y que además eran producto de la interacción con el receptor arilo de hidrocarburos (AHR) que ayudaba a la diferenciación celular.

En una revisión hecha por *Sigaux y colaboradores* (37) esclarecen como el MP<sub>2.5</sub> está involucrado en el desarrollo de AR, ya que inducen (RONS) y promueve la producción de IL-6, lo que provoca inflamación local inicialmente. La citrulinación de proteínas vecinas es promovida tanto de la inflamación local, como también por la producción de DEP presentes en MP<sub>2.5</sub>, de igual manera, puede resultar en la producción de otras citocinas proinflamatorias (IL-17, IL-23, TNF- $\alpha$ ) y de varias quimiocinas (incluida CXCL13) involucradas en la formación de estructuras linfoides terciarias como iBALT. Dentro de la zona T de las estructuras iBALT, las CD presentan proteínas citrulinadas que actúan como antígenos, a las células T vírgenes, luego interactúan con las células B que se activan y diferencian en plasmocitos que por último producen ACPA, anticuerpos generalmente presentes en el líquido de lavado broncoalveolar.

## **2.Marco teórico**

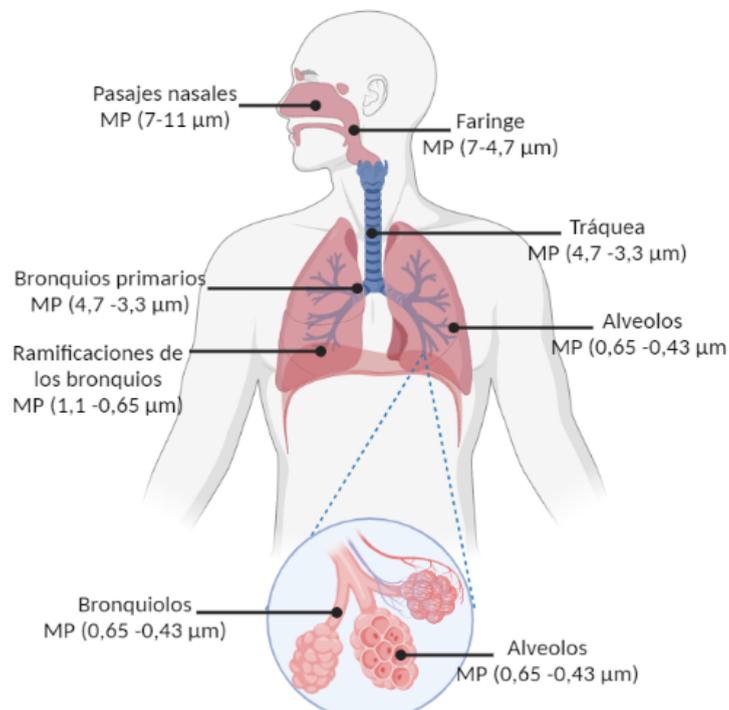
### **2.1 Bases teóricas**

#### **2.1.1 Vías respiratorias y Material particulado (MP)**

Las vías respiratorias y los espacios alveolares son ricos en componentes susceptibles de redox: ácidos grasos poliinsaturados, metales, oxígeno y células inflamatorias. El pulmón como uno de los principales órganos del sistema respiratorio tiene la mayor superficie

expuesta al medio ambiente en el humano, su tejido está bastante vascularizado y tiene diferentes funciones esenciales para la supervivencia fisiológica del cuerpo, además de ser una fuente de oxígeno para cargar hemoglobina y también una forma para eliminar el dióxido de carbono como producto principal del metabolismo, lamentablemente el intercambio tan elevado de componentes ambientales que se realizan en el órgano lo predisponen a generar un ambiente inflamatorio que puede perdurar por mucho tiempo al igual que lo predisponen a convertirse en una estructura linfoide terciaria (16).

La contaminación del aire es una mezcla de miles de componentes físicos, químicos o biológicos, todos son dañinos para la salud humana, pero los efectos más graves se han atribuido al material particulado (MP) y al Ozono ( $O_3$ ), en especial el MP se caracteriza por estar compuesto de partículas en suspensión con una infinidad de formas y tamaños, lo que les permite filtrarse en diferentes partes del sistema respiratorio, su filtración es proporcional al tamaño, es decir, las partículas gruesas, se pueden quedar en los pasajes nasales, la faringe o la tráquea, mientras que las partículas finas y ultrafinas pueden hacerlo en los bronquios primarios, bronquiolos y alveolos (15,35).



**FIGURA 1 Filtración material particulado en vías respiratorias**

El material particulado según su diámetro aerodinámico (DA) tiene la capacidad de penetrar el tracto respiratorio, por lo tanto, entre más pequeña sea la partícula más facilidad tendrá de

llegar a circulación sanguínea ya que puede fluir entre los compartimientos más pequeños del aparato sin tener restricción alguna. Fuente: Elaboración propia.

El MP se expulsa a la atmósfera siendo producto de diferentes actividades naturales o antropogénicas, se pueden encontrar partículas tanto sólidas como líquidas emitidas directamente al aire tales como DEP, polvo de carreteras, el polvo de la agricultura y las partículas resultantes de procesos industriales, el MP tiene la capacidad de no sedimentarse y permanecer suspendido en el aire por mucho tiempo debido a su tamaño y densidad. Son una compleja mezcla de productos, incluidos metales, sales, materiales carbonosos, compuestos orgánicos volátiles (COV), hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y endotoxinas que después de todo pueden interactuar entre sí formando nuevos compuestos (38).

Gracias a su infinidad de formas, tamaños y composición variada, se disponen varias clasificaciones que se relacionan entre sí, no obstante, la más acertada se basa en el diámetro aerodinámico ( $PM_{10}$ ,  $PM_{2,5}$  y  $PM_{0,1}$  respectivamente) (15), que corresponde al diámetro de una esfera uniforme en una unidad de densidad que alcanza la misma velocidad terminal de sedimentación de la partícula diana; basado en esta clasificación se permite analizar cómo es su comportamiento en el aire, en las superficies y la trayectoria de las partículas dentro del sistema respiratorio (14,38).

### **2.1.2 Material particulado e inflamación**

El paso de las diversas partículas en las vías respiratorias promueve la generación de inflamación tanto local (partículas gruesas y finas) como sistémica (partículas finas y ultrafinas), esto se debe a varios mecanismos que logran alterar la funcionalidad de los tejidos; conforme disminuye el tamaño de cada partícula en suspensión su capacidad para generar efectos tóxicos aumenta, puede ser por la habilidad de penetrar diferentes órganos y que algunas partículas pueden ingresar a la circulación a través de la barrera aire-sangre, o por el contrario, a la cualidad de acumularse en los mismos, lo que produce estrés oxidativo, inflamación pulmonar y sistémica que finalmente se asocian a una perturbación de la operatividad del sistema (12).

Ante la exposición del MP en las vías respiratorias, se generan varias interacciones humorales y celulares que contribuyen a la inflamación, la primera interacción se observa en

los componentes de la inmunidad innata ya que se ocasiona un influjo rápido y masivo de neutrófilos que se acompañan de la liberación de citocinas proinflamatorias (p. Ej., TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) (37); también por parte de las células presentadoras de antígeno (CPA) mediante la interacción del MP con la membrana o con los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), se activarán varios factores de transcripción (p. Ej., Nrf2, NF- $\kappa$ B, HIF-1, AP-1 etc.) (19) involucrados en la producción de más citoquinas y en la exposición de antígenos a linfocitos Th0 (33). Varias de estas citoquinas se relacionan exclusivamente a la naturaleza y el diámetro de las partículas. Un claro ejemplo de ellos se observa con TNF- $\alpha$  e IL-6 las cuales tienen una mayor concentración asociadas a partículas finas y ultrafinas, por el contrario, IL-8 se expresa continuamente sin importar el tamaño de la partícula (39).

Como respuesta celular, los macrófagos alveolares además de ser un puente para la inmunidad adaptativa a través de la activación de linfocitos T efectores y linfocitos B, liberan RONS al igual que los neutrófilos induciendo así alteraciones en las proteínas, particularmente las asociadas con el ADN y con la actividad mitocondrial, y causan necrosis celular además de apoptosis. RONS también se encargan de la activación y liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET), un proceso conocido como NETosis (5), este proceso va acompañado de elevación de los niveles de IL-17 e IL-23 que están implicados en la formación de iBALT (34).

Las células de la inmunidad adaptativa aparecen tras la generación de estrés oxidativo, la anterior producción de citoquinas inflamatorias, la activación por CPA, la formación de iBALT (33), entre otras; no obstante, su principal relación ante la interacción con MP se refleja en la activación del receptor arilo de hidrocarburos (40), AhR es un factor de transcripción que pertenece a la familia de proteínas *basic-helix-loop-helix / Per-Arnt-sim* (bHLH / PAS). Su principal función está en la regulación de la expresión de las enzimas metabolizadoras de xenobióticos y su eliminación del organismo. (Los xenobióticos son pequeñas moléculas que no se encuentran naturalmente en el cuerpo y que pueden tener una difícil degradación) (37).

AHR también forma interacciones proteicas con otros factores de transcripción para controlar la actividad transcripcional de varios genes diana (p. Ej., STAT, NF $\kappa$ B y receptores para ácido

retinoico y estrógenos), se identificó por primera vez como un receptor de dioxinas como la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), que se liberan en el medio ambiente durante los procesos de combustión naturales e industriales. Otros factores ambientales, como la radiación ultravioleta pueden activar AHR. Por lo tanto, es un mediador clave del papel del medio ambiente en el metabolismo y la respuesta inmune. (40). Sin embargo, su activación también puede inducir una respuesta antiinflamatoria y expandir el conjunto de células Treg. Algunos ligandos exógenos inducen la expansión de la población CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Treg, cabe resaltar que esta población celular es importante para mantener la tolerancia inmunológica (3,37).

### **2.1.3 Estrés oxidativo**

Continuamente a partir de reacciones metabólicas, los organismos se exponen a oxidantes, bien sea endógenamente (por ejemplo, del transporte de electrones mitocondriales durante la respiración o durante la activación de las CPA) o exógenamente (como la inhalación de contaminantes del aire) (16), por vía exógena el órgano diana de los oxidantes es el pulmón, dichos oxidantes a partir de diversos mecanismos logran desestabilizar la funcionalidad pulmonar y generar un estrés, para evitar estas adversidades el pulmón cuenta con un sistema que liberará antioxidantes como Glutathion peroxidasa (GSH), enzimas SOD (Superóxido dismutasa), catalasa, entre otros, que finalmente reestablecerán la homeostasis redox, varios procesos logran esta regulación, entre ellos está la competencia con otros sustratos oxidables y, por tanto, un retraso o inhibición significativa de la oxidación de estos sustratos (41). Sin embargo, cuando la proporción entre oxidantes y antioxidantes es desigual, es decir hay una mayor cantidad de oxidantes, se ocasiona un proceso conocido como estrés oxidativo (19).

Los principales compuestos encargados de generar estrés oxidativo son las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS) las cuales se constituyen principalmente del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), el óxido nítrico (NO) (Aunque en concentraciones bajas puede cumplir un papel como mensajero paracrino) y el radical hidroxilo (•OH), estas moléculas se caracterizan por ser inestables con electrones desapareados, capaces de activar la oxidación (17).

Tanto el NO como el anión superóxido son radicales libres lo que les permite ser muy reactivos, estas moléculas rápidamente tienen la capacidad de reaccionar entre sí, formando

un oxidante mucho más potente como el peroxinitrito que también puede reaccionar con el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) formando una ruta influyente de degradación de compuestos biológicos o reaccionar con otra clase de moléculas en un entorno biológico (16,17,34).

En humanos, en condiciones y concentraciones normales RONS cumplen funciones esenciales como moléculas de señalización para otras funciones fisiológicas, entre las más importantes se encuentran: la regulación del tono vascular, la monitorización de la tensión de oxígeno en el control de la ventilación y la producción de eritropoyetina (Hormona fundamental en la hematopoyesis), y la transducción de señales de los receptores de membrana en varios procesos fisiológicos (34).

Sin embargo, un concomitante aumento de oxidantes y por ende la producción de estrés oxidativo se evidencia directamente con la oxidación de macromoléculas como el ADN de las proteínas y varios lípidos, ocasionando daño pulmonar directo. Como ya se mencionó, el pulmón por ser el órgano en el que más se genera este ambiente oxidativo induce una variedad de respuestas celulares a través de la generación de especies de oxígeno reactivas metabólicas secundarias, las cuales sus nuevos productos participan directa o indirectamente en reacciones catalizadas por metales de transición, entre los que se destacan el hierro y el cobre concluyendo en la alteración de otros procesos fisiológicos (16,34). Por último, el estrés oxidativo puede afectar la remodelación de la matriz extracelular, inducir respiración mitocondrial y promover la proliferación celular con el fin de efectuar mecanismos de protección en los pulmones, un claro ejemplo de ello es la aparición del surfactante pulmonar para disminuir la tensión superficial y promover la liberación de antiproteasas (41).

#### **2.1.4 Inflamación y Enfermedades autoinmunes (EAI)**

Ante una exposición continua a estresores ambientales, tanto la inflamación local como sistémica perduran, esto a modo de mecanismo de defensa en el que participan varios leucocitos y moléculas plasmáticas que se trasladan al lugar del daño y posterior a ello se diseminan en la circulación (2). Un proceso inflamatorio se caracteriza por generar efectos que faciliten la movilización celular, tales como un aumento de flujo sanguíneo y el incremento de la permeabilidad vascular frente a los componentes humorales y celulares (16). En este proceso participan componentes tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa,

por una parte, en la inmunidad innata los neutrófilos y los monocitos que después se transforman en macrófagos migran a la zona inflamada, en estos procesos liberan citoquinas que mejoran la polarización hacia un perfil proinflamatorio, mientras que en la inmunidad adaptativa los linfocitos se activan a partir de la interacción con un antígeno, después de ello, los linfocitos T también se desplazan a la zona de inflamación, mientras que los linfocitos B y una subpoblación de linfocitos T se comienzan a acumular en tejidos linfoides, el traslado celular seguirá promoviendo un ambiente inflamatorio por reclutamiento de otras poblaciones celulares y liberación de más proteínas que subsistan este proceso fisiológico (2,4).

Como ya se ha mencionado, múltiples factores influyen en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes a partir de la exacerbación y sobreestimulación del sistema inmune promoviendo así la generación de respuestas contra componentes propios obteniendo como resultado la alteración parcial de la tolerancia inmunológica (5,42,43), la inflamación local no es ajeno a esto ya que si persiste e incluso se vuelve en inflamación sistémica, se interpreta directamente con una mayor reclutación de varios componentes efectores celulares y humorales y una menor proporción de componentes reguladores (2-4,33).

Cuando se genera un ambiente inflamatorio continuo aparecen elementos clave en la fisiopatología de varias enfermedades autoinmunes tanto sistémicas como órgano-específicas, entre los más importantes se destacan, la sobreestimulación de linfocitos efectores (Th1, Th2, Th17), la polarización de un perfil de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, IL-23, TNF- $\alpha$ , etc.), la aparición de células autorreactivas que posterior a su aparición se infiltran en tejidos propios y generan daño acompañado de la producción de autoanticuerpos e incluso la formación de nuevas estructuras linfoides, entre otros (29,30,31); cabe resaltar que todos los elementos resaltados trabajan conjuntamente favoreciendo la manifestación de fenómenos autoinmunes (3).

### **2.1.5 Artritis Reumatoide**

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica, inflamatoria y crónica que se caracteriza por generar daño principalmente en las articulaciones a partir de la inflamación, produciendo así hipertrofia de la membrana sinovial con consecuente daño articular, destrucción ósea, cartilaginosa y deformidad de múltiples áreas, no obstante,

también puede generar cambios inflamatorios en localizaciones extraarticulares (nódulos reumatoides, daño pulmonar y vasculitis) promoviendo la desregulación de la tolerancia inmunológica (4,52). Asimismo, se ha evidenciado que la artropatía se manifiesta a partir de susceptibilidades tanto genéticas como epigenéticas pero que también surge a partir de factores externos como la exposición al polvo urbano, el humo de cigarrillo y el microbioma (5) ya que se ejerce una interacción continua entre los componentes del sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo, facilitando la disrupción del equilibrio fisiológico celular y humoral (28), por consiguiente después de la alteración del sistema, aparece una respuesta humoral que conduce a la aparición de autoanticuerpos, en los que en AR se destacan principalmente: Anticuerpos contra proteínas modificadas postraduccionalmente como los anticuerpos anti proteína modificada que comprende el grupo de anticuerpos contra modificaciones tales como la citrulinación (ACPA), la carbamilación (aCarp) y la acetilación (AAPA) y además anticuerpos distintos al grupo en mención como el factor reumatoide (FR). Sin embargo, la aparición de estos anticuerpos no es un distintivo o signo patognomónico de AR, ya que se ha evidenciado la presencia de los mismos en otras patologías o incluso en pacientes sanos (6).

### **3. Diseño Metodológico**

#### **3.1 Pregunta problema**

¿Cuáles son los efectos biológicos del material particulado en las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide?

#### **3.2 Objetivos**

##### **3.2.1 Objetivo general**

Analizar los efectos y las alteraciones biológicas producidas por el material particulado sobre PBMCs de pacientes con artritis reumatoide (AR).

##### **3.2.2 Objetivos específicos**

- Estudiar el efecto del material particulado en la viabilidad de las células de pacientes con artritis reumatoide.

- Identificar las alteraciones producidas por el material particulado en la síntesis de citoquinas pro y anti-inflamatorias en células de pacientes con artritis reumatoide.
- Determinar el efecto del material particulado sobre las vías de señalización en células provenientes de pacientes con artritis reumatoide.

### **3.3 Justificación**

Las EAIs son un problema de salud pública dado que son crónicas e incurables, además de tener altos niveles de morbilidad y mortalidad (6,8), actualmente se estima entre un 5% a un 7% donde se prevé un posible aumento con el transcurso de los años, de la cifra mencionada, entre el 75% y el 80% son mujeres, teniendo una probabilidad mayor de 2.7 de desarrollar una enfermedad autoinmune que un hombre (10).

Cabe resaltar que el origen de las EAIs es multifactorial, factores internos y externos hacen parte de su desarrollo, por lo tanto, la suma de estos factores y su interacción se conoce como exposoma (5), lo cual nos permite identificar de cierta forma cómo evolucionan estas enfermedades y cómo se genera la pérdida de la tolerancia.

Por otro lado, en los últimos años, ha aumentado la contaminación notablemente en los recursos naturales por distintas causas, entre ellas, la sobrepoblación, el crecimiento económico, la globalización, entre otras (11); generando así alteraciones medioambientales a las que están expuestas las personas en el transcurso de su vida, siendo esto un determinante de la salud puesto que la intensidad de exposición específica a algún recurso natural se asocia con el desarrollo de un conjunto de enfermedades o intoxicaciones originando problemas de salubridad (12).

La contaminación atmosférica ha sido un blanco de estudio, específicamente componentes como el material particulado (MP) y el ozono (O<sub>3</sub>), debido a que son las moléculas que están más presentes y estructuran el aire, destacando que exposiciones prolongadas de las mismas son a las que se les atribuye la causalidad de varias afecciones respiratorias, por ser contaminantes cuya vía de entrada al organismo es por vía inhalatoria (12,13)

El presente trabajo hará énfasis en identificar el efecto *in vitro* del MP sobre las vías de señalización y varios procesos celulares específicos que influyen en el desarrollo y/o progreso de la pérdida de la tolerancia inmunológica en pacientes con AR.

### **3.4 Marco conceptual**

- Enfermedades autoinmunes: Artritis Reumatoide
- Etiología de las enfermedades autoinmunes: Exposoma
- Material particulado: Efecto pro-inflamatorio
- Inflamación: Local y sistémica
- Estrés oxidativo
- Receptor Arilo de hidrocarburos
- Proteínas Citrulinadas

### **3.5 Marco legal**

**3.5.1 Ley 1392 de 2010:** Por medio de la cual se reconocen las enfermedades huérfanas como de especial interés y se adoptan normas tendientes a garantizar la protección social por parte del Estado colombiano a la población que padece de enfermedades huérfanas y sus cuidadores (44).

**3.5.2 Decreto 1954 de 2012:** Por el cual se dictan disposiciones para implementar el sistema de información de pacientes con enfermedades huérfanas (45).

**3.5.3 Resolución 2048 de 2015:** Por la cual se actualiza el listado de enfermedades huérfanas y se define el número con el cual se identifica cada una de ellas en el sistema de información de pacientes con enfermedades huérfanas (46).

**3.5.4 Resolución 5265 de 2018:** Por la cual se actualiza el listado de enfermedades huérfanas y se dictan otras disposiciones (47).

**3.5.5 Resolución 946 de 2019:** Mediante la cual se establecen disposiciones en relación con la notificación de enfermedades huérfanas al Sistema de Vigilancia en Salud Pública y con el Registro Nacional de Personas con Enfermedades Huérfanas (48).

### **3.6 Normatividad ética**

Este estudio se realizó dentro de las normas éticas y acorde a la declaración de Helsinki (49) que incluye:

- Este estudio se desarrolló según los requisitos de la actividad en investigación en salud planteados en la resolución 8430 del Ministerio de Salud de 1993, predominando el criterio del respeto a la dignidad y la protección de los derechos y el bienestar de las personas.
- Este estudio ha sido aprobado por el comité de ética en investigación de la Universidad del Rosario. Para ello, se remitieron todos los documentos solicitados por parte del comité de ética para su revisión, los cuales incluyen el formato del consentimiento informado, la metodología del estudio, junto con la forma y registros de inclusión de pacientes dentro del estudio, la información teórica sobre el tema a investigar y cualquier información adicional solicitada por el comité
- Se dispuso de un consentimiento informado que incluía la información necesaria para que el paciente con EAI tome la decisión de participar o no en el estudio. Si la decisión era negativa no afectaría la buena relación médico-paciente según las normas de buena práctica médica. Adicionalmente, se dispuso de un consentimiento informado para la inclusión de individuos control
- Esta investigación es clasificada como: "Investigación con riesgo mínimo", de acuerdo con los preceptos de la resolución 8430 del Ministerio de Salud de 1993, incluyendo el registro de datos a través de procedimientos comunes consistentes en: exámenes físicos o psicológicos rutinarios y extracción de sangre por punción venosa.
- Se salvaguardó la confidencialidad mediante el uso de códigos con el fin de mantener el anonimato de los individuos. No se publicarán ni se darán a conocer datos de casos particulares
- Toda la información recopilada en los formularios fue almacenada en una base de datos con código específico, cuyo acceso será exclusivo de los investigadores del presente estudio. Esta información, así como las muestras será almacenada y custodiada por el CREA hasta el momento en que los participantes manifiesten el deseo de desechar la muestra y toda la información recopilada.
- Las muestras con fines de investigación fueron almacenadas en el repositorio de muestras del Centro de Estudio de Enfermedades Autoinmunes (CREA) de la Universidad del Rosario. A estas muestras sólo tendrán acceso los investigadores que hacen parte del estudio.

- Los pacientes con EAIs se beneficiaron directamente de este estudio, mediante la entrega de resultados de laboratorio, que fueron comunicados vía telefónica por personal médico especializado, quien aclaró las dudas en ese momento o a futuro. Además, estos resultados le sirvieron a su reumatólogo tratante, quien indicó el curso de acción médico más adecuado en su siguiente cita.

### **3.7 Tipo de investigación**

La investigación que se llevará a cabo es de tipo mixta debido a que hay tanto elementos explicativos como descriptivos, es importante aclarar que se contarán con casos y controles los cuales son esenciales porque permitirán proyectar una parte práctica en la que se procura identificar los mecanismos que tiene el MP para generar alteraciones en diferentes mecanismos fisiológicos y metabólicos en ensayos *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) provenientes de pacientes con un previo diagnóstico de AR.

### **3.8 Nivel, enfoque o alcance de la investigación**

El enfoque aplicado en la investigación es experimental mixto, puesto que cumple con las características que definen un estudio de esta clase, es exploratorio debido a que al ser un tema poco estudiado puede sentar bases para futuras investigaciones, descriptivo porque se identifican las modificaciones obtenidas a la exposición y finalmente contiene un componente explicativo donde se sustenta la razón del por qué se generan las alteraciones presuntivas.

### **3.9 Población de estudio y muestra**

La población de estudio estará conformada por un grupo de individuos casos y un grupo de individuos control. El grupo de casos incluirá personas que ya tengan un diagnóstico previo de AR a partir de criterios de inclusión (Basados en los Criterios de clasificación de EULAR/ACR de AR de 2010). Estos participantes se incluirán en el estudio en el momento del diagnóstico inicial, antes de empezar el tratamiento indicado para su enfermedad. Los casos serán reclutados de manera no probabilística a conveniencia según la frecuencia de consulta.

El grupo de controles será un grupo apareado por sexo, edad y lugar de procedencia al grupo de casos. Se realizará un estudio clínico y serológico (perfil 25 autoanticuerpos) para confirmar que los casos no presentan poliautoinmunidad latente y los controles no tienen autoinmunidad.

### 3.9.1 Criterios de inclusión

Pacientes mayores de edad (Mayores de 18 años) que cumplan los criterios internacionales de clasificación diagnóstica para AR con diagnóstico inicial de la enfermedad sin tratamiento previo.

### 3.9.2 Criterios de exclusión

Menores de edad (menores de 18 años), embarazo, lactancia, enfermedad fatal progresiva, pacientes con alteraciones inmunológicas transitorias o inmunodeficiencias primarias, pacientes trasplantados y pacientes con poliautoinmunidad (50).

### 3.10 Tamaño de la muestra

Para los estudios *in vitro*, se basará en un estudio piloto de medición de citoquinas efectuado en pacientes con EAI. Se utilizará la fórmula estadística de comparación de dos grupos con varianzas iguales:

$$n_{controles} = n_{casos} = 2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 * S^2 / d^2$$

- $S^2$  es la varianza de ambas distribuciones, que se suponen iguales.
- $Z_{\beta}$  es el valor del eje X de la función normal estándar en donde se acumula la probabilidad de  $(1 - \beta)$ .
- $Z_{\alpha}$  es el valor del eje X de la función normal estándar en donde se acumula la probabilidad de  $(1 - \alpha)$ .
- $d$ : Es la diferencia esperada, que para ser biológicamente relevante sería de más de 80 pg/mL.

Aceptamos un error de tipo 1 de  $\alpha = 0.05$  y deseamos un poder estadístico de  $(1 - \beta) = 90\%$  para detectar diferencias si es que existen.

Por estudios previos se sabe que las varianzas muestrales de las mediciones a efectuar no varían entre los grupos. La varianza más grande que se prevé obtener es para la medición de citoquinas que es la variable más dispersa, siendo esta de  $S=79$  (datos preliminares de medición de citoquinas) (51).

$$n_{\text{controles}} = n_{\text{casos}} = 2$$

De esta forma para los ensayos *in vitro* el tamaño de muestra de cada grupo será de 2 individuos por grupo.

### **3.11 Procedimiento**

Todos los individuos (casos y controles) fueron invitados e informados para participar en el estudio, a los individuos que aceptaron participar se les solicitó su aprobación mediante firma del consentimiento informado. A los participantes del estudio se les realizó una venopunción según el protocolo establecido en el CREA. A cada participante se le tomaron dos tubos de  $\approx 7$  mL de sangre en tubos con anticoagulante (EDTA) para la obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs por sus siglas en inglés) de la siguiente manera:

#### **3.11.1 Aislamiento PBMCs**

Por cada caso se extrajeron 2 tubos de aproximadamente 7 mL de sangre en tubos EDTA. Posterior a ello, se pasaron los 15 mL de la sangre obtenida a un tubo falcón de 50mL para diluirla con medio RPMI incompleto (Sin Suero fetal bovino ni Penicilina+Estreptomicina) hasta tener una proporción 1:1 para mezclarse por inversión; por otra parte, se añadieron 15 mL de Ficoll Histopaque previamente atemperado, se agregaron los 30 mL de sangre junto con el medio RPMI incompleto para evitar romper la capa del Ficoll, se centrifugó a 500 gravedades durante 30 minutos y a temperatura ambiente.

Cuando la formación del gradiente se completó, se retiró el acúmulo celular blanquecino que correspondía a las PBMC's (Sin perturbar el pellet que contenía eritrocitos y granulocitos) , este acúmulo se dispuso en un tubo falcon de 15 mL y se agregó medio RPMI completo (Enriquecido con suero fetal bovino al 10% y 50 unidades de Penicilina más Estreptomicina) hasta completar un volumen de 14 mL, se mezcló por inversión, nuevamente se centrifugó a 500 gravedades durante 10 minutos a 4° C; luego se añadieron 5 mL de RPMI completo y se repitió el proceso de centrifugación dos veces, terminado este procedimiento se sacó una

alícuota de 50 uL para hacer conteo celular, se centrifugó y finalmente al pellet se le agregaron 3mL de (DMSO + SFB al 10%) y se separaron en crioviales de 1mL para congelar las células en nitrógeno líquido.

### **3.11.2 Ensayo viabilidad celular con Azul de Tripán**

Para contar las células obtenidas después de la separación por Ficoll Histopaque y para ver su viabilidad después de cultivarlas junto con el contaminante o con algún agente que las estresara, se implementó el colorante azoico azul de tripán al 0.4% que permite diferenciar las células vivas de las muertas, ya que las células viables excluyen el colorante y microscópicamente son de color hialino o transparente, mientras que las células que tienen algún defecto en su membrana y están muertas, permiten la entrada del colorante y se tiñen de un color azul oscuro. Se utilizaron 50uL de células suspendidas en medio RPMI y 50uL del colorante para mantener una proporción 1:1, en la cámara de Neubauer se agregaron 20uL de la mezcla en el extremo de la unión laminilla cámara, se procedió a contar en los 4 cuadrantes y se hicieron los respectivos cálculos.

$$\text{Promedio de las células contadas en los cuadrantes} \times \text{Factor de dilución} \times 10^4 = \text{Células/mL}$$

### **3.11.3 Estimulación *in vitro* de PBMCs**

Para identificar la presencia de citoquinas o cambios postraduccionales en proteínas relacionadas con vías de señalización o con la aparición de un ambiente inflamatorio, las PBMCs se estimularon con diferentes compuestos, tales como PMA+Ionomicina, lipopolisacáridos (LPS) y una referencia estándar de material particulado SRM1649b.

#### **3.11.3.1 Estimulación *in vitro* de PBMCs con PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) + Ionomicina de controles**

Con el fin de encontrar proteínas fosforiladas para western blot, se estimularon las células con diferentes concentraciones de PMA+Ionomicina puesto que son potentes agentes mitógenos que actúan preferentemente sobre el crecimiento y la proliferación de linfocitos T y estimula la producción intracelular de las citocinas IL-2 e IL-4 a partir de la activación la enzima de transducción de señales proteína quinasa C.

Esta estimulación se realizó con ausencia del mitógeno y con presencia del mismo a diferentes concentraciones de PMA(Concentración inicial de 10mg/mL), pero a la misma concentración de la Ionomicina (3.7mg/mL) (Tabla 1), en el caso de las células, se

descongeló un criovial y se lavó rápidamente con medio completo dos veces, luego se realizó conteo en cámara de Neubauer para saber la cantidad de células que habían en 1mL y se concentraron, de tal modo que hubiese aproximadamente  $5.6 \times 10^5$  células en 250uL en medio RPMI, transcurrido un periodo de estimulación de 72h las células fueron recolectadas para estudios de viabilidad y para hacer lisis celular.

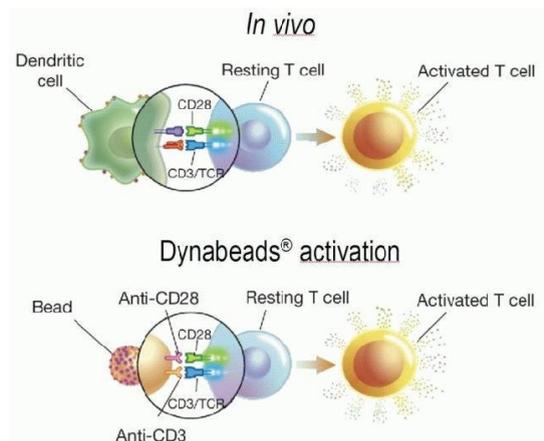
**Tabla 1:** Diagrama placa con PMA+ Ionomicina para un volumen final de 500µL en placa de 24 pozos

	Control	PMA 25ng/uL+ Ionomicina 250ng/mL	PMA 50ng/uL+ Ionomicina 250ng/mL	PMA 100ng/uL+ Ionomicina 250ng/mL	PMA 200ng/uL+ Ionomicina 250ng/mL	PMA 500 ng/uL+ Ionomicina 250ng/mL
Estímulo con PMA+ Ionomicina	250uL RPMI Completo + 250uL de Células	250uL de células + 1.25 uL de PMA + 33,3 uL Ionomicina + 215 uL RPMI	250uL de células + 2.5 uL de PMA + 33,3 uL Ionomicina + 214 uL RPMI	250uL de células + 5 uL de PMA + 33,3 uL Ionomicina + 212 uL RPMI	250uL de células + 10 uL de PMA + 33,3 uL Ionomicina + 207 uL RPMI	250uL de células + 25 uL de PMA + 33,3 uL Ionomicina + 192 uL RPMI
Estímulo con PMA+ Ionomicina	250uL RPMI Completo + 250uL de Células	250uL de células + 1.25 uL de PMA + 33,3 uL Ionomicina + 215 uL RPMI	250uL de células + 2.5 uL de PMA + 33,3 uL Ionomicina + 214 uL RPMI	250uL de células + 5 uL de PMA + 33,3 uL Ionomicina + 212 uL RPMI	250uL de células + 10 uL de PMA + 33,3 uL Ionomicina + 207 uL RPMI	250uL de células + 25 uL de PMA + 33,3 uL Ionomicina + 192 uL RPMI

### 3.11.3.2 Estimulación *in vitro* de PBMCs con LPS y CD3/CD28 de controles

Se intentó reconocer proteínas fosforiladas para western blot con otros agentes estimulantes que generan la fosforilación en un tiempo más corto, esta vez se utilizó LPS que es parte de la capa más externa de bacterias gramnegativas y es un patrón molecular asociado a patógenos (PAMP), este agente es utilizado para estimulación de linfocitos a partir de la respuesta inmune innata con las células presentadoras de antígeno (CPA). Se utilizó Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* L4524 5mg de Sigma que venía liofilizado y resuspendió en 1mL de PBS 1X para tener una concentración de 5mg/mL y sacar alícuotas.

Además, en la misma placa, pero en diferentes pozos se utilizó un mitógeno de anticuerpos monoclonales, en este caso se usaron perlas magnéticas CD3/CD28 del kit Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell expansion and activation, según el protocolo del kit para lograr la estimulación se debe tener una proporción 1:1 con las PBMC's, este kit contiene  $4 \times 10^7$  perlas/mL, después de lograr la proporción entre células y perlas, se añadió 1mL de buffer BSA-BD, se agitó por 5 minutos y el tubo se colocó en un magneto por un minuto para que finalmente se pudiera eliminar el sobrenadante, posterior a ello se añade el medio RPMI +10% SFB.



**FIGURA 2 Esquema activación in vitro Dynabeads**

Las perlas magnéticas actúan como una célula presentadora de antígeno, que al entrar en contacto con un linfocito T, genera la activación del mismo a través de la interacción de anticuerpos anti CD3 y anti CD28 que están unidos a las perlas y los receptores TCR y CD28 característicos en la población de linfocitos T.

Como no se habían visualizado bandas en proteínas fosforiladas con los western blot, esta vez se usaron una mayor cantidad de PMBCs recién separadas por gradiente de densidad, luego se realizó conteo en cámara de Neubauer para saber la cantidad de células que habían en 1mL y se concentraron, de tal modo que hubieran aproximadamente  $3.3 \times 10^6$  células en 500uL de medio RPMI, como sólo se quería ver si se activaron las vías de señalización a partir de la fosforilación de proteínas, transcurrido un periodo de estimulación de 24h las células fueron recolectadas para hacer lisis celular

**Tabla 2:** Diagrama placa con LPS y CD3/CD28 para un volumen final de 1000µL en placa de 24 pozos

	<b>Control</b>	<b>100ng/mL LPS</b>	<b>100ng/mL LPS</b>	<b>CD3/CD28</b>	<b>CD3/CD28</b>
<b>PBMCs</b>	500uL PBMC's + 500uL RPMI Completo	500uL PBMC's + 480uL RPMI Completo + 20uL de LPS	500uL PBMC's + 480uL RPMI Completo + 20uL de LPS	500uL PBMC's + 500uL RPMI (incluye 84 uL Dynabeads)	500uL PBMC's + 500uL RPMI (incluye 84 uL Dynabeads)
<b>PBMCs</b>	500uL PBMC's + 500uL RPMI Completo	500uL PBMC's + 480uL RPMI Completo + 20uL de LPS	500uL PBMC's + 480uL RPMI Completo + 20uL de LPS	500uL PBMC's + 500uL RPMI (incluye 84 uL Dynabeads)	500uL PBMC's + 500uL RPMI (incluye 84 uL Dynabeads)

### 3.11.3.3 Estimulación *in vitro* de PBMC's con material particulado

Para la estimulación de las PBMC's se utilizó la referencia estándar Urban dust NIST SRM 1649b que viene en una presentación de 2g (Está compuesta de Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y sus derivados, plaguicidas clorados, bifenilos policlorados, compuestos inorgánicos, entre otros) esta referencia logra asemejarse al polvo urbano. Para lo anterior es necesario resuspender la referencia y sonicar para liberar las partículas.

### 3.11.4 Preparación Urban dust NIST SRM 1649b

En un falcon de 50mL se añadieron 40mL de PBS 1x, se agregaron los 2g de la referencia estándar a usar para finalmente someter la mezcla a sonicación en hielo durante 40min por 20KHz, todo en cabina extractora y bajo condiciones de bioseguridad con el fin de tener la primera concentración stock que corresponde a 50.000 µg/mL, a partir del primer stock se hicieron diluciones seriadas para tener diferentes concentraciones de la referencia estándar.

**Tabla 3:** Diluciones seriadas de la referencia estándar 1649b

<b>Stock de trabajo</b>	<b>50.000 µg/mL (1er Stock)</b>	
<i>2<sup>do</sup> Stock</i>	40µL 1 <sup>er</sup> Stock (50.000 µg/mL) + 960µL de Medio	<b>Volumen final:</b> 1mL <b>Concentración Final:</b> 2000µg/mL
<i>3<sup>er</sup> Stock</i>	25µL 2 <sup>do</sup> Stock (2000 µg/mL) + 75µL de Medio	<b>Volumen final:</b> 100µL <b>Concentración Final:</b> 500µg/mL
<i>4<sup>to</sup> Stock</i>	6,25µL 3 <sup>er</sup> Stock (500 µg/mL) + 93,75µL de Medio	<b>Volumen final:</b> 100µL <b>Concentración Final:</b> 125µg/mL
<i>5<sup>to</sup> Stock</i>	2,5µL 4 <sup>to</sup> Stock (125 µg/mL) + 97,5µL de Medio	<b>Volumen final:</b> 100µL <b>Concentración Final:</b> 50µg/mL

**Medio:** RPMI + Suero fetal bovino 10% + Penicilina y Estreptomicina

### 3.11.5 Estimulación *in vitro* mitógeno junto con el contaminante SRM1649b

Para la estimulación de las PBMCs de controles, las células se cultivaron en placas de cultivo de 24 pozos junto con el mitógeno de anticuerpos monoclonales CD3/CD28.

Esta estimulación se realizó con ausencia del contaminante y con presencia del mismo a diferentes concentraciones (50µg/mL, 10µg/mL, 2,5 µg/mL y 1 µg/mL; concentraciones

dentro del rango que sugiere la literatura) transcurrido el periodo de estimulación (24h, 48h, y 72h) las células fueron recolectadas para estudios de viabilidad y citotoxicidad.

**Tabla 4:** Diagrama de cada pozo con diferentes concentraciones de SRM1649b y CD3/CD28 para un volumen final de 500µL en placa de 24 pozos

	<i>Células sin estimular</i>	<i>Cél.+ CD3/CD28</i>	<i>Cél.+ CD3/CD28+ SRM1649b 50µg/mL</i>	<i>Cél.+ CD3/CD28+ SRM1649b 10µg/mL</i>	<i>Cél.+ CD3/CD28+ SRM1649b 2,5µg/mL</i>	<i>Cél.+ CD3/CD28+ SRM1649b 1µg/mL</i>
<b>Células</b>	250 µL (736.000 células)	250 µL (736.000 células)	250 µL (736.000 células)	250 µL (736.000 células)	250 µL (736.000 células)	250 µL (736.000 células)
<b>CD3/CD28</b>	_____	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL
<b>SRM1649B</b>	_____	_____	12,5 µL de Stock 2 (2000µg/mL)	10 µL de Stock 3 (500µg/mL)	10 µL de Stock 4 (125µg/mL)	10 µL de Stock 5 (50 µg/mL)
<b>Medio RPMI</b>	250 µL	230 µL	217,5 µL	220 µL	220 µL	220 µL

No obstante, al no observar cambios significativos en la viabilidad y citotoxicidad, se aumentó la concentración del contaminante (100ng/mL, 10ng/mL y 1ng/mL) y la cantidad de células por pozo ( $1 \times 10^6$ ), para esto se contaron las células en cámara de Neubauer y se concentraron para que en 250uL quedará la cantidad deseada, y esta vez se estimuló con células de casos y controles; a las 36h se recogió el sobrenadante para la medición de citoquinas, las células se recolectaron por separado, se lavaron 3 veces con PBS 1X y se realizó ensayo de viabilidad celular con azul de tripán a las células que tenían la mayor concentración del contaminante.

**Tabla 5:** Diagrama de cada pozo con diferentes concentraciones de SRM1649b y CD3/CD28 para un volumen final de 500µL en placa de 24 pozos

	<i>Sin estímulo/ Control</i>	<i>CD3/CD28</i>	<i>SRM1649b (100 ug/mL)</i>	<i>SRM1649b (10 ug/mL)</i>	<i>SRM1649b (1 ug/mL)</i>
<b>Células (<math>1 \times 10^6</math>)</b>	250uL	250uL	250uL	250uL	250uL
<b>CD3/CD28</b>	-----	25uL	25uL	25uL	25uL
<b>SRM1649b</b>	-----	-----	25uL stock 200µg/mL	10uL stock 500 µg/mL	10uL stock 50 µg/mL
<b>Medio RPMI Completo</b>	250uL	225uL	200uL	215uL	215uL

Este ensayo se realizó por duplicado, en los dos casos de AR y los dos controles.

### **3.11.6 Ensayo de citotoxicidad con concentraciones de 50µg/mL, 10µg/mL, 2,5 µg/mL y 1 µg/mL del contaminante**

Para evaluar el efecto citotóxico del material particulado SRM1649b se realizó ensayo de citotoxicidad por MTT el cual se basa en la reducción de una sal de tetrazolio (Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) o MTT a cristales de formazán púrpura por enzimas oxidorreductasas dependientes de NADPH de células metabólicamente activas. Pasadas las 24h de incubación con el estímulo del mitógeno y el contaminante, de la placa de 24 pozos se pasaron 100 µL a una placa de cultivo de 96 pozos y se agregaron 10 µL de MTT (A una concentración de 0.5mg/mL) a cada pozo y se incubó por 4h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después del periodo de incubación se agregaron 100 µL de la solución solubilizadora que venía con el kit y se dejó en reposo toda la noche a las mismas condiciones de incubación. Finalmente se hizo lectura de los pozos a una longitud de onda de 595 nm y para la corrección se hizo una segunda lectura a 655nm como lo sugirió el kit. Este ensayo se repitió para las 48h y 72h post-estímulo.

### **3.11.7 Ensayos de viabilidad por citometría de flujo con concentraciones de 50µg/mL, 10µg/mL, 2,5 µg/mL y 1 µg/mL del contaminante**

Para cada tiempo se evaluó la tasa de mortalidad de las células por citometría de flujo (*FASCantoII*, *BD Biosystems*), con la ayuda de marcadores de apoptosis temprana como la Anexina-V y marcadores de apoptosis tardía y/o necrosis como el 7AAD. Estos marcadores permiten evaluar la tasa de mortalidad inducida por la referencia estándar del material particulado a diferentes concentraciones. Para este ensayo se usó parte del volumen restante del estímulo con CD3/CD28, en los 400 µL restantes de cada pozo en el ensayo de estimulación se eliminaron las perlas presentes con un imán, se recogieron las células en un eppendorf y se lavaron con PBS 1X, se centrifugó a 700 gravedades por cinco minutos, se desechó el sobrenadante y se repitió el lavado y la centrifugación con las mismas condiciones, después se agregaron 50 µL de buffer binding 1X-Anexina, 5 µL de Anexina y 5 µL de 7AAD, se incubó por 15 minutos en oscuridad y finalmente se añadieron 100 µL de solución FACS flow para citometría. Este ensayo se repitió para las 48h y 72h post estímulo.

### **3.11.8 Western blot para estudios de vías de señalización**

Para evaluar el impacto de la referencia SRM1649b sobre las vías de señalización implicadas en la activación de factores de transcripción, se realizó western blot para la identificación de proteínas totales y asimismo para evaluar la fosforilación de las mismas puesto que juegan un papel esencial en las vías de señalización de las EAIs, sin embargo, para analizar el comportamiento de la referencia en pacientes control y pacientes con AR, era necesario estandarizar la técnica para proteínas totales y proteínas fosforiladas que se encuentran en menor concentración.

#### **3.11.8.1 Estandarización Western blot**

##### **3.11.8.2 Lisado Western blot**

Para separar las proteínas presentes en las PBMCs era necesario generar una lisis en las mismas, para ello, se utilizaron entre  $1.5 \times 10^6$  a  $3 \times 10^6$  células previamente contadas en cámara de Neubauer, se centrifugaron a 700 gravedades por 8 minutos y se eliminó los sobrenadantes, a los pellets restantes se les agregaron 400  $\mu\text{L}$  (en el caso de  $1.5 \times 10^6$ ) o 800  $\mu\text{L}$  (en el caso de  $3 \times 10^6$ ) de inhibidores de proteasas y fosfatasa Pierce Ref. A32961 diluidas en buffer de lisis (RIPA), se incubaron 20 minutos en hielo y se centrifugaron a 12000rpm por 20 min a  $4^\circ\text{C}$ , se guardaron los sobrenadantes en otros tubos eppendorf. Para la preparación del Sample buffer (SB) 4X se usaron 900  $\mu\text{L}$  de SB4X más 100  $\mu\text{L}$  de beta mercaptoetanol y para la preparación de las muestras a un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  se usaron 18.8  $\mu\text{L}$  de la muestra más 6.3  $\mu\text{L}$  de SB; se pusieron las mezclas en termobloque a  $100^\circ\text{C}$  durante 7 minutos, se les realizó un spin y los lisados se guardaron a  $-20^\circ\text{C}$  en congelador hasta su próximo uso.

##### **3.11.8.3 SDS-PAGE**

Los lisados obtenidos se separaron mediante un gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio NuPAGE™ 4 a 12% de Invitrogen que contenía agua desionizada, Tris HCl 1.5 M, SDS al 10%, acrilamida/bis al 30%, APS al 10% y TEMED. Posteriormente, las muestras se sembraron y se utilizó como patrón de peso molecular Plus prestained protein ladder 10 a 250kda Ref 26619, se corrieron en una cámara de electroforesis con un voltaje de 80v en la

fase de concentración y de 110v en la fase de separación con buffer de corrido NuPAGE™ MES SDS.

### 3.11.8.4 Western blot

Para la transferencia se utilizó una membrana de Fluoruro de polivinilideno (PVDF) previamente activada durante 1 minuto con metanol absoluto. El montaje de la transferencia de los lisados celulares se realizó de la siguiente manera: un corte de papel Whatman extra grueso, la membrana activada de PVDF, gel de corrido de poliacrilamida y nuevamente un corte de papel Whatman extra grueso humedecidos con buffer de transferencia NuPAGE (Tris 25 mM, glicina y metanol 20%) La transferencia en la cámara se corrió durante 70 minutos a 25v, para corroborar que la transferencia se había hecho correctamente, se tiñó el gel de poliacrilamida con azul de Coomassie (Metanol 15mL, ácido acético 3mL, agua desionizada 12mL y Coomassie 0.015g a 0.05%) durante 20 minutos. El proceso de desteñido se realizó con solución decolorante compuesta de 5mL de ácido acético y 15mL de metanol durante una hora, para visualizar efectivamente que no habían quedado restos de proteína en el gel.

Una vez terminada la transferencia se cortó la membrana y se dispuso en solución de bloqueo TBS 1X (50mM Tris base, 150mM NaCl y pH: 7.6) + Tween 0.1% + (BSA/Leche descremada al 5% dependiendo del protocolo del anticuerpo a implementar) por 2h, cumplidas las 2h de bloqueo se procedió agregar el anticuerpo primario (Tabla 6) y se dejó en agitación toda la noche a 4°C, al día siguiente las membranas se lavaron tres veces con TBS 1X-T 0.1% por diez minutos cada uno. Pasado el tiempo las membranas lavadas se dejaron junto con el anticuerpo secundario en solución de bloqueo por 2h, se lavaron nuevamente con TBS-T tres veces por diez minutos. Para la revelación se hizo una dilución 1:1 de los reactivos de ECL Western blotting substrate Ref. 32209, se agregaron en las membranas y las mismas se leyeron en el equipo C-DiGit® Blot Scanner de LI-COR para lectura de membranas por quimioluminiscencia con el software Image Studio Digits 5.0 a una sensibilidad alta por 12 minutos.

**Tabla 6:** Respectivos anticuerpos primarios y secundarios con sus características para western blot.

Anticuerpo	Dilución	Peso Molecular (kda)	Bloqueo	Anticuerpo Secundario
------------	----------	----------------------	---------	-----------------------

Beta Actina #A3853	1/3000	42	Leche	Anti- Mouse
AKT (Pan) (C67E7) Rabbit #4691	1/1000	60	BSA	Anti- Rabbit
p38 MAPK (D13E1) Rabbit #8690	1/1000	40	BSA	Anti- Rabbit
NF-κB p65 (D14E12) Rabbit #8242	1/1000	65	BSA	Anti- Rabbit
JNK1 (2C6) Mouse #3708	1/1000	46	BSA	Anti- Mouse
Stat1 (9H2) Mouse #9176	1/1000	84-91	Leche	Anti- Mouse
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) Rabbit #4060	1/1000	60	BSA	Anti- Rabbit
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) #9211	1/1000	43	BSA	Anti- Rabbit
Phospho-NF-κB p65 (Ser536) (E1Z1T) Mouse #13346	1/1000	65	BSA	Anti-Mouse
Phospho-Stat1 (Tyr701) (58D6) Rabbit #9167	1/1000	84-91	BSA	Anti- Rabbit
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (81E11) Rabbit #4668	1/1000	46	BSA	Anti- Rabbit
(sc-436) MEK-1/2 Antibody (12-B)	1/500	46	Leche	Anti- Rabbit
p-MEK-1/2 Anticuerpo (Ser 218/Ser 222): sc-7995	1/500	47	Leche	Anti- Goat
ERK 2 Anticuerpo (C-14): sc-154	1/500	42	Leche	Anti- Rabbit
p-ERK Anticuerpo (E-4): sc-7383	1/500	43	Leche	Anti- Mouse
Anti-phosphotyrosine Antibody, clone 4G10 ZooMAb® Mouse Monoclonal	1/500	80	BSA	Anti- Mouse

### 3.11.9 Determinación de citoquinas por Cytometric Bead Array (CBA)

Las citoquinas juegan un papel importante en la exacerbación o el control de la respuesta inmune. Por lo que, en las EAIs, se observa un gran desbalance en el nivel de expresión de dichas moléculas. Para evaluar el efecto de los contaminantes en la producción de citoquinas, el sobrenadante de las PBMCs estimuladas *in vitro*, fue recolectado a las 36 horas. Un análisis multiplex de citoquinas fue realizado por citometría de flujo a través del sistema *Cytometric Bead Array CBA* de *Becton Dickinson*. El ensayo CBA es una variante de la citometría de flujo que se distingue por emplear beads (también llamadas perlas), que contiene diferentes tamaños y están revestidas con una fracción de anticuerpos contra una

citoquina determinada. Luego de la unión de ambas, otro anticuerpo marcado con un fluorocromo (Ficoeritrina/ PE) se une a la citoquina formando de este modo un complejo que pasa por la celda de detección del citómetro de flujo, que cuenta con un láser que incide sobre el complejo. Luego es posible medir la intensidad de fluorescencia media y a través de curvas estándar determinar la concentración de cada una de ellas. Los resultados obtenidos se analizaron con el programa FCAP Array v3.0. El panel de citoquinas que se evaluó ha sido seleccionado según la pertinencia de estas en EAI: IL-1B, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, MCP-1, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF y RANTES.

Inicialmente se reconstituye el estándar de cada ensayo 15 minutos antes de realizarse las diluciones con 4 mL del diluyente estándar, luego se dejó en agitación durante 15 minutos, se mezcló con cuidado y se agregaron 500uL del diluyente del estándar a tubos de vidrio que estaban marcados con la siguiente forma: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256, luego se realizaron diluciones seriadas agregando 500uL de cada estándar al tubo siguiente, se agitó con cuidado en cada dilución, en el caso del tubo que contenía el estándar no diluido este sirvió como la concentración del estándar más alto, mientras que el diluyente del estándar sirvió como control negativo con concentración de 0 pg/mL; la concentración aproximada de cada dilución, se observa de la siguiente forma:

**Tabla 7:** Concentraciones aproximadas de cada dilución, ensayo CBA

	Tubo de dilución								
	Estándar superior	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Citoquina (pg/mL)	2.500	1.250	625	312.5	156	80	40	20	10

Para mezclar las beads, se agitó cada tubo con la suspensión que tenía beads de captura, esto se hizo entre 5-10 segundos antes de mezclarlos con las muestras, había 20 muestras, pero el ensayo se preparó para 23 muestras con 19 citoquinas como lo sugirió el inserto, por ende, se utilizaron 713 uL del diluyente de captura, luego se determinó el volumen total de beads diluidas necesarias, lo que correspondió a 1150uL para las 23 muestras, luego se determinó el volumen necesario para cada captura teniendo como resultado 23 uL por cada citoquina.

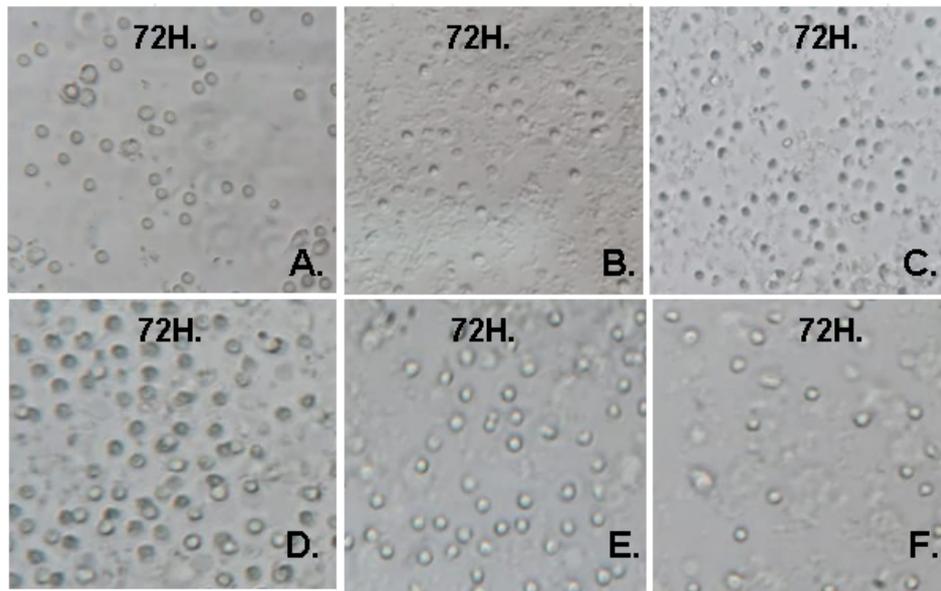
Después de mezclar bien las beads de captura, se agregaron 50 uL a cada tubo de ensayo, después se añadieron 50uL de cada sobrenadante obtenido del cultivo, esto se incubó durante 1h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se añadieron 50uL de la mezcla de reactivo de

detección de citoquinas (preparado de la misma manera que el de captura) a cada tubo de ensayo y se incubó 2h a 4°C protegido de la luz. Tras la incubación se añadió 1mL del buffer de lavado a cada tubo de ensayo y se centrifugó a 200g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante de cada tubo de ensayo y se añadió nuevamente buffer de lavado a cada tubo de ensayo para resuspender el sedimento de las beads.

#### 4. Resultados

##### 4.1 Estimulación *in vitro* de PBMCs con PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) + Ionomicina de controles

Se realizó registro fotográfico de la observación microscópica bajo objetivo de 40X en microscopio invertido de las PBMCs bajo diferentes condiciones (diferentes concentraciones de PMA, pero misma concentración de Ionomicina) a las 72h como se ilustra en la figura 3, observando una disminución de población celular sin formación de clusters o aumento de tamaño de las células que es un indicativo de la activación de linfocitos.



**FIGURA 3 PBMC's con y sin estímulo con diferentes concentraciones de PMA después de 72h.**

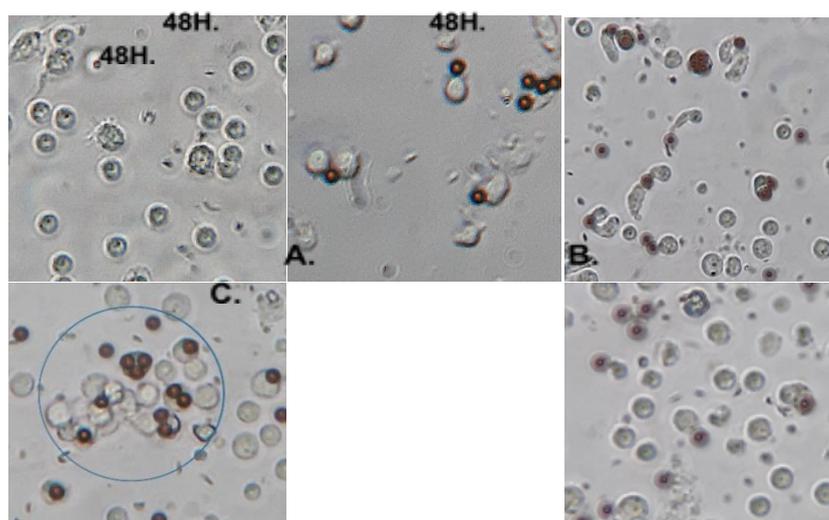
**A.** Células Control sin estímulo **B.** Células con 25ng/mL de PMA y 250 ng/mL de Ionomicina **C.** Células con 50 ng/mL de PMA y 250 ng/mL de Ionomicina **D.** Células con 100 ng/mL de PMA y 250 ng/mL de Ionomicina **E.** Células con 200 ng/mL de PMA y 250 ng/mL de Ionomicina **F.** Células con 500 ng/mL de PMA y 250 ng/mL de Ionomicina.

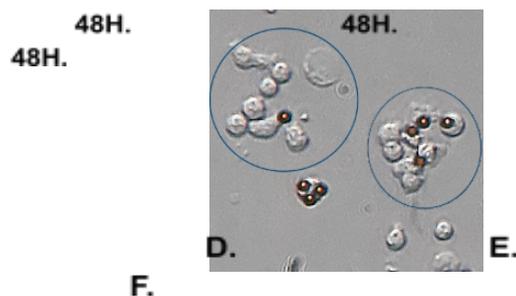
Al visualizar los pozos por duplicado en el microscopio se observó que hubo una disminución significativa de la cantidad celular en casi todas las concentraciones a excepción

de los pozos que tenían concentraciones del PMA de 50 ng/mL y 100 ng/mL, en el caso de los pozos con 500 ng/mL las células no eran refringentes y su membrana estaba deformada, por ende, para evaluar su viabilidad, se recolectaron los duplicados en tubos eppendorf, se centrifugaron a 500g por 10 minutos, se les removió el sobrenadante y se agregó PBS 1X, este procedimiento se realizó dos veces para lavar las células, después se sacó una alícuota de 20 uL de cada duplicado y se realizó ensayo con azul de tripán, en este ensayo se determinó que había  $5.45 \times 10^5$  células en los pozos que estaban sin estimular,  $5.25 \times 10^5$  células en los pozos con 25 ng/mL de PMA y 250 ng/mL de Ionomicina,  $5.6 \times 10^5$  células en los pozos con 50 ng/mL de PMA y 250 ng/mL de Ionomicina,  $5.61 \times 10^5$  células en los pozos con 100 ng/mL de PMA y 250 ng/mL de Ionomicina,  $5.1 \times 10^5$  células en los pozos con 200 ng/mL de PMA y 250 ng/mL de Ionomicina y finalmente,  $2.1 \times 10^5$  células en los pozos con 500 ng/mL de PMA y 250 ng/mL de Ionomicina, evidenciando que las células no se estaban activando sino por el contrario se disminuyó la cantidad de la población viable en la mayoría de las concentraciones, por ende, se concluyó que el PMA estaba siendo tóxico para las células. Sin embargo, se continuó con el lisado celular para visualizar fosforilaciones en Western blot

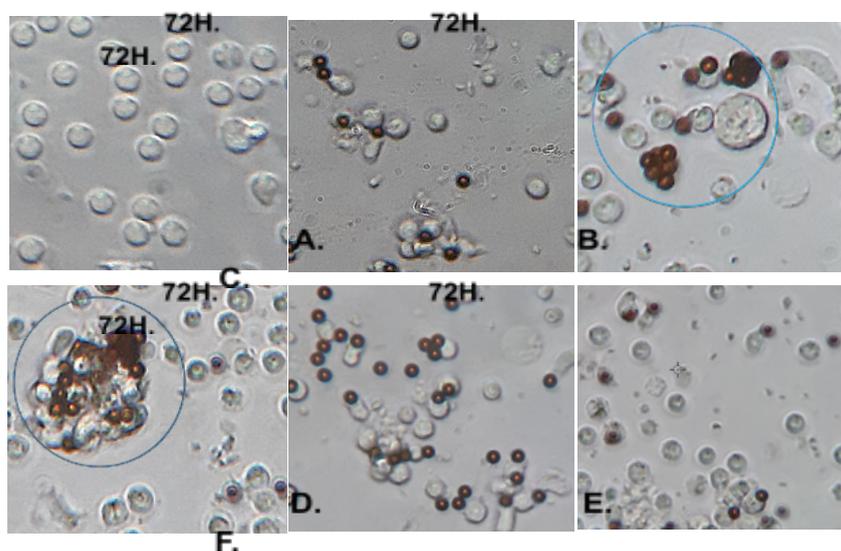
#### **4.2 Estimulación *in vitro* con mitógeno (Perlas magnéticas CD3/CD28) y contaminante SRM1649B**

Se realizó registro fotográfico de la observación microscópica bajo objetivo de 40X en microscopio invertido de las PBMCs en diferentes condiciones: sin estímulo, con CD3/CD28 y con diferentes concentraciones de la referencia SRM1649B en dos tiempos, a las 48 y 72 horas de incubación; como se ilustra en la Figura 1 se logra visualizar las células morfológicamente uniformes adheridas a las perlas magnéticas, además, en algunos campos se logró observar la agrupación de las mismas, o la formación de clusters y un aumento de tamaño en algunos campos lo que indica una activación celular inducida por las perlas y posiblemente por el material particulado.





**Figura 4: PBMCs con y sin estímulo más diferentes concentraciones de la referencia SRM1649B en dos tiempos diferentes (48H y 72H); A. Células sin estímulo B. Células con CD3/CD28 C. Células con CD3/CD28 y SRM1649B 50 µg/mL D. Células con CD3/CD28 y SRM1649B 10 µg/mL E. Células con CD3/CD28 y SRM1649B 2.5 µg/mL F. Células con CD3/CD28 y SRM1649B 1 µg/mL; los círculos representan la formación de clusters de las PBMCs.**

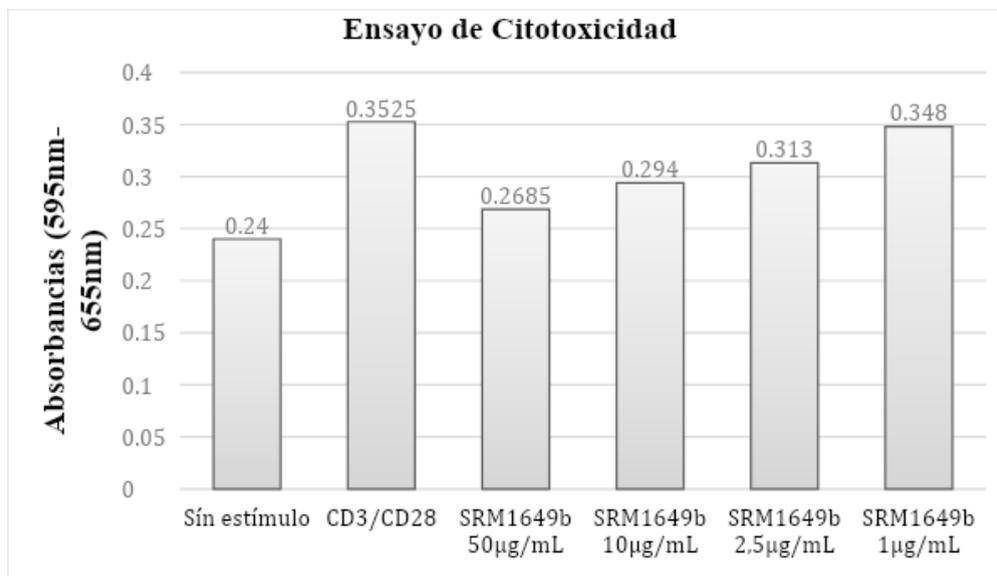


**A. Células sin estímulo B. Célula con CD3/CD28 C. Células con CD3/CD28 y SRM1649B 50 µg/mL D. Células con CD3/CD28 y SRM1649B 10 µg/mL E. Células con CD3/CD28 y SRM1649B 2.5 µg/mL F. Células con CD3/CD28 y SRM1649B 1 µg/mL; los círculos representan la formación de clusters de las PBMC's.**

#### **4.3 Ensayo Citotoxicidad con MTT con concentraciones de 50µg/mL, 10µg/mL, 2,5 µg/mL y 1 µg/mL del contaminante**

Para identificar los efectos citotóxicos que tiene la referencia SRM1649B a diferentes concentraciones en presencia de un estímulo con CD3/CD28 como mitógeno en las PBMCs se leyó la absorbancia después del ensayo en dos ocasiones, esto con el fin de hacer una corrección a las lecturas; como se evidencia en la figura 2, se produjeron cambios proporcionales a la concentración empleada de la referencia lo que permite suponer que a mayor concentración de la referencia hay una disminución de la actividad metabólica de las

PBMCs, sin embargo, estos resultados se deben correlacionar con los observados en los ensayos de viabilidad. Este ensayo se montó por duplicado, utilizando células sin estimular como control.

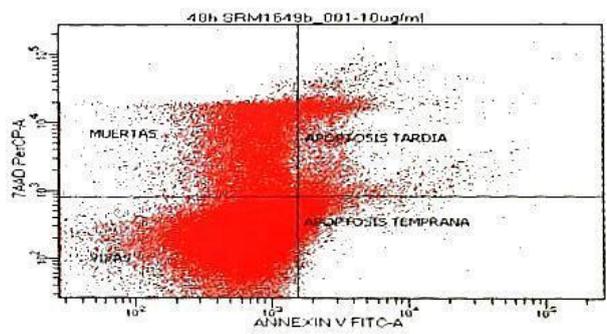
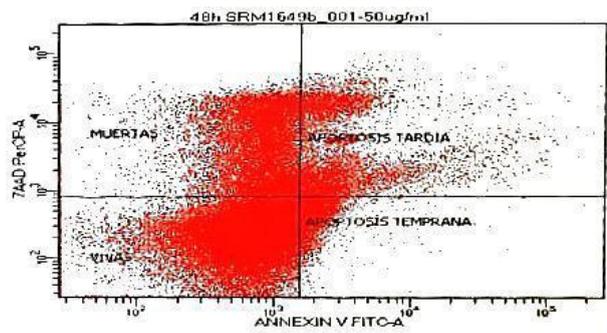
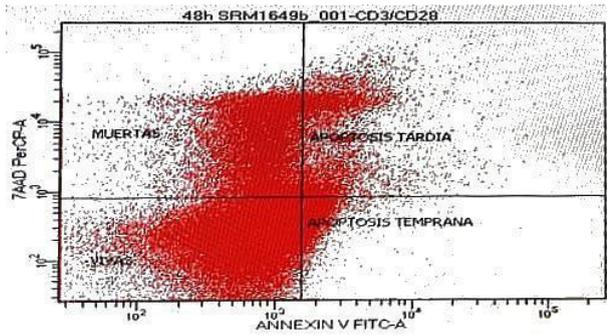
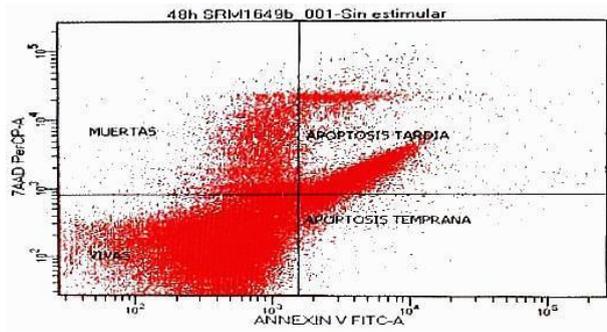


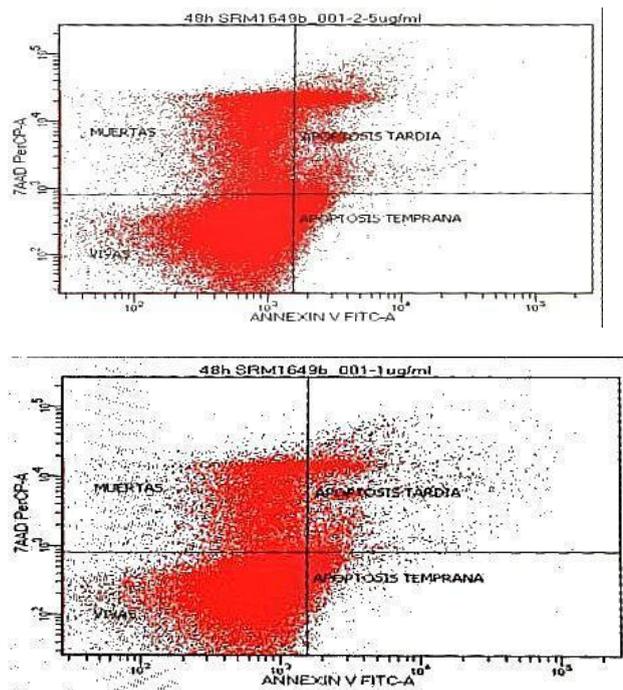
**FIGURA 5. Comparación de absorbancias de PBMCs de paciente control**

Se midieron las absorbancias por espectrofometría de las células en diferentes condiciones, este ensayo fue realizado a las 24h y según indicaciones del inserto del kit, se realizó una corrección de absorbancia con otra longitud de onda.

#### **4.4 Ensayo Viabilidad (Anexina/7AAD) con concentraciones de 50µg/mL, 10µg/mL, 2,5 µg/mL y 1 µg/mL del contaminante**

Se utilizaron marcadores de apoptosis temprana y tardía como ensayo de viabilidad para identificar la respuesta que tuvieron las células del paciente control ante la exposición con la referencia del material particulado en diferentes concentraciones con la presencia del estímulo y sin él, en la figura 3 se logró observar que las variaciones de las concentraciones no generaron un cambio de viabilidad significativo, sin embargo, antes de sugerir un aumento de concentración es indispensable ver a partir de las vías de señalización si existen cambios intracelulares, por el contrario, si en las vías no se ven alteraciones intracelulares se supone que se trabajaron con condiciones muy por debajo de concentraciones que generen efectos citotóxicos.

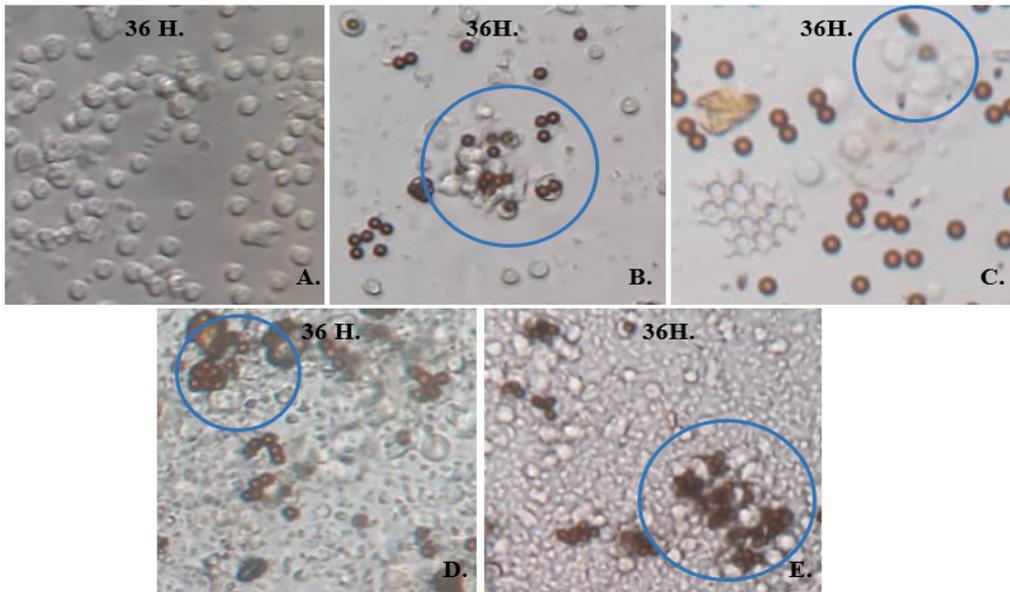




**FIGURA 6 Resultados citometría de flujo de PBMCs de paciente control**

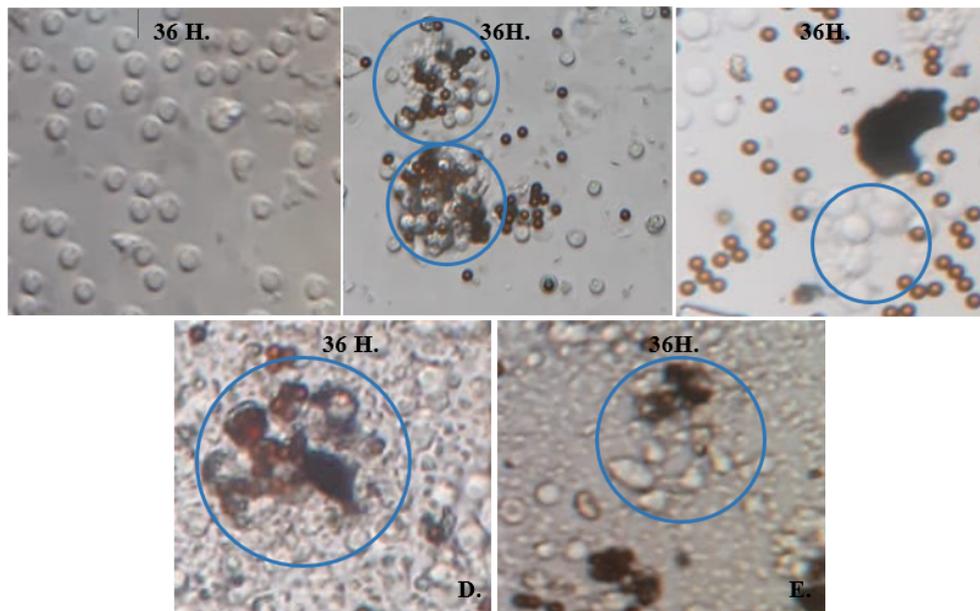
Este ensayo de viabilidad se realizó con células expuestas a diferentes concentraciones del material particulado (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) con presencia y ausencia de CD3/CD28

Como no se observaron cambios significativos en la estimulación de las PBMCs con diferentes concentraciones del contaminante y en presencia del mitógeno, se aumentó la concentración del contaminante y la cantidad de células como se mencionó anteriormente, pasadas las 36h se realizó registro fotográfico de la observación microscópica bajo objetivo de 40X de las PBMCs en diferentes condiciones: sin estímulo, con CD3/CD28 y con diferentes concentraciones de la referencia SRM1649B con los dos casos de AR y los dos casos control, como se ilustra desde la figura 7 hasta la figura 10, se logra visualizar las células morfológicamente uniformes adheridas a las perlas magnéticas, además, en algunos campos se logró observar la agrupación de las mismas, o la formación de clusters y un aumento de tamaño en algunos campos lo que indica una activación celular inducida por las perlas y posiblemente por el material particulado.



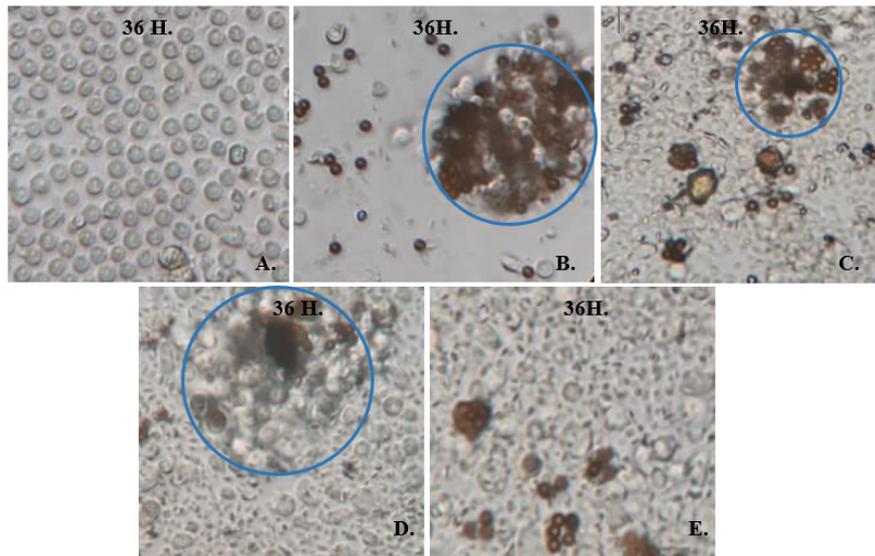
**FIGURA 7 PBMCs de primer caso de AR**

Células con y sin estímulo junto con diferentes concentraciones de la referencia SRM1649B a las 36h **A.** Células sin estímulo **B.** Células con CD3/CD28 **C.** Células con CD3/CD28 y SRM1649B 100 µg/mL **D.** Células con CD3/CD28 y SRM1649B 10 µg/mL **E.** Células con CD3/CD28 y SRM1649B 1 µg/mL; los círculos representan la formación de clusters de las PBMCs.



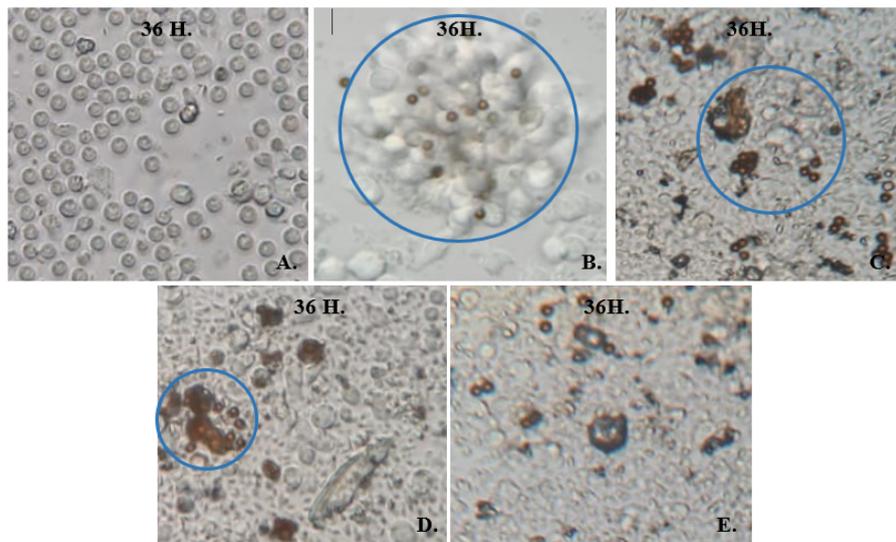
**FIGURA 8 PBMCs de segundo caso de AR**

Células con y sin estímulo junto con diferentes concentraciones de la referencia SRM1649B a las 36h **A.** Células sin estímulo **B.** Células con CD3/CD28 **C.** Células con CD3/CD28 y SRM1649B 100 µg/mL **D.** Células con CD3/CD28 y SRM1649B 10 µg/mL **E.** Células con CD3/CD28 y SRM1649B 1 µg/mL; los círculos representan la formación de clusters de las PBMCs.



**FIGURA 9 PBMCs de primer caso control**

Células con y sin estímulo junto con diferentes concentraciones de la referencia SRM1649B a las 36h **A.** Células sin estímulo **B.** Células con CD3/CD28 **C.** Células con CD3/CD28 y SRM1649B 100 µg/mL **D.** Células con CD3/CD28 y SRM1649B 10 µg/mL **E.** Células con CD3/CD28 y SRM1649B 1 µg/mL; los círculos representan la formación de clusters de las PBMCs.



**FIGURA 10 PBMCs de segundo caso control**

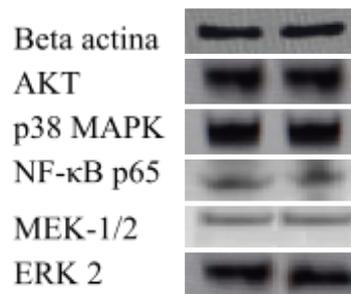
Células con y sin estímulo junto con diferentes concentraciones de la referencia SRM1649B a las 36h **A.** Células sin estímulo **B.** Células con CD3/CD28 **C.** Células con CD3/CD28 y SRM1649B 100 µg/mL **D.** Células con CD3/CD28 y SRM1649B 10 µg/mL **E.** Células con CD3/CD28 y SRM1649B 1 µg/mL; los círculos representan la formación de clusters de las PBMCs.

Finalmente, para evaluar la viabilidad de las células después del estímulo de 36h, se realizó conteo por ensayo de exclusión de Azul de tripán en cámara de Neubauer sólo a las células que contenían la mayor concentración del contaminante (100 µg/mL), puesto que

anteriormente se había realizado un ensayo Viabilidad (Anexina/7AAD) con concentraciones inferiores y no se habían visto cambios significativos, en este caso, se recolectaron los duplicado en tubos eppendorf, se lavaron con PBS 1X, se sacó la alícuota de 20uL y se contó en la cámara, antes del estímulo se tenían  $1 \times 10^6$  células por pozo, es decir  $2 \times 10^6$  células en cada duplicado, al realizar el conteo se obtuvo que para el primer caso de AR habían  $1.97 \times 10^6$  células, para el segundo caso de AR habían  $2 \times 10^6$  células, para el primer caso control  $1.94 \times 10^6$  células, por último para el segundo caso control  $2.05 \times 10^6$  células, es decir que el contaminante SRM1649b no afectó significativamente la viabilidad de las PBMC's tanto en casos como en controles.

#### 4.5 Western blot

Se estandarizó el western blot, para la identificación de proteínas totales y proteínas fosforiladas en un control, en el caso de proteínas totales, se estandarizaron cinco proteínas (AKT, p38 MAPK, NF- $\kappa$ B p65, MEK-1/2 y ERK 2), como gen constitutivo se utilizó beta actina; la incubación de la membrana de PVDF con solución de bloqueo, anticuerpo primario y secundario se realizó como los protocolos de cada anticuerpo lo indicaban.



**FIGURA 11. Estandarización de proteínas totales para Western blot**

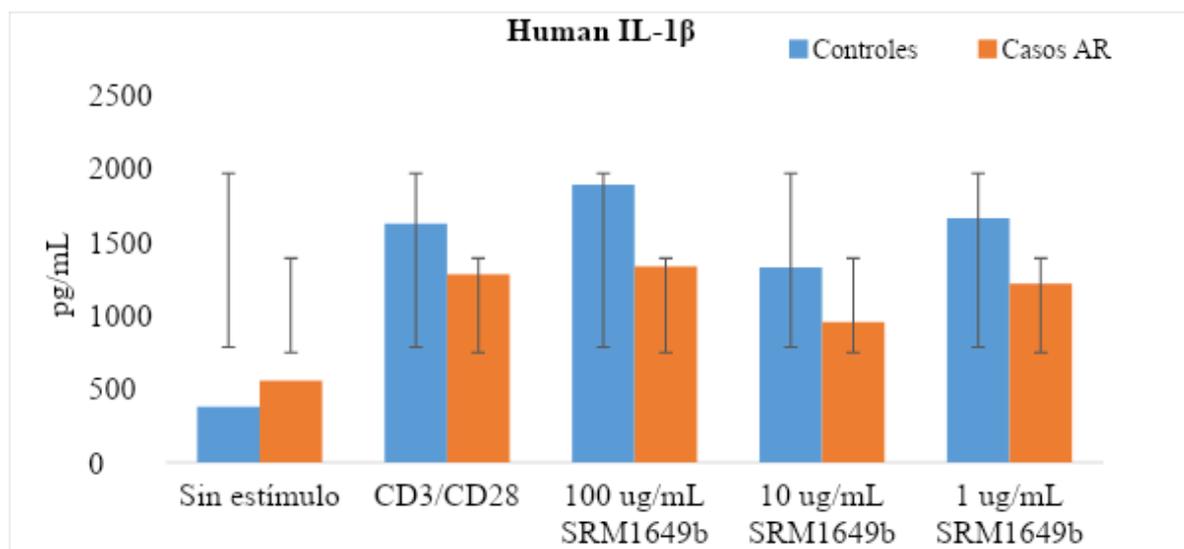
Cada ensayo se realizó por duplicado, en el caso de STAT-1 y JNK1 no se obtuvieron bandas, este resultado fue bajo las indicaciones de la casa comercial de cada anticuerpo, sin embargo, se cambiaron las condiciones de incubación, se aumentó la dilución de los anticuerpos, se reemplazó la solución de bloqueo según informes basados en la literatura con el fin de obtener bandas, pero no se logró.

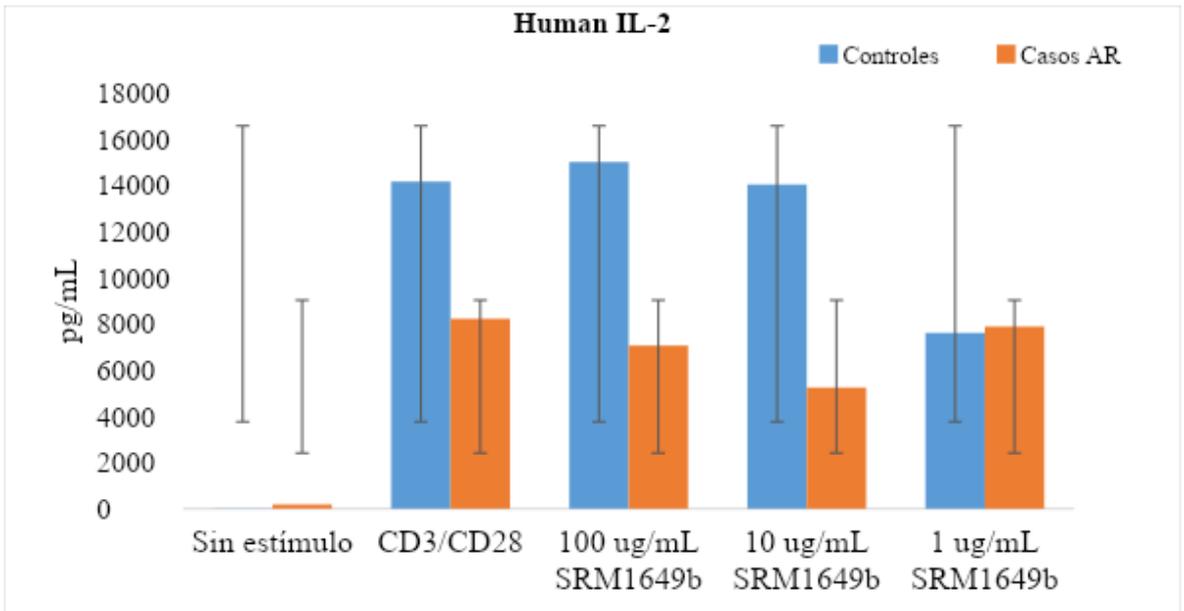
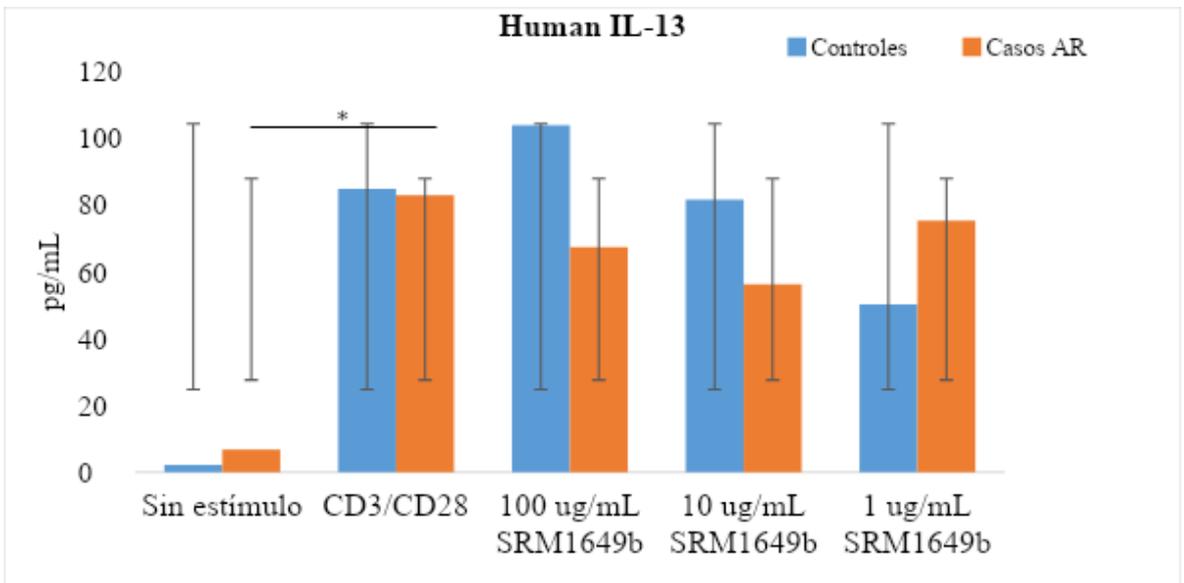
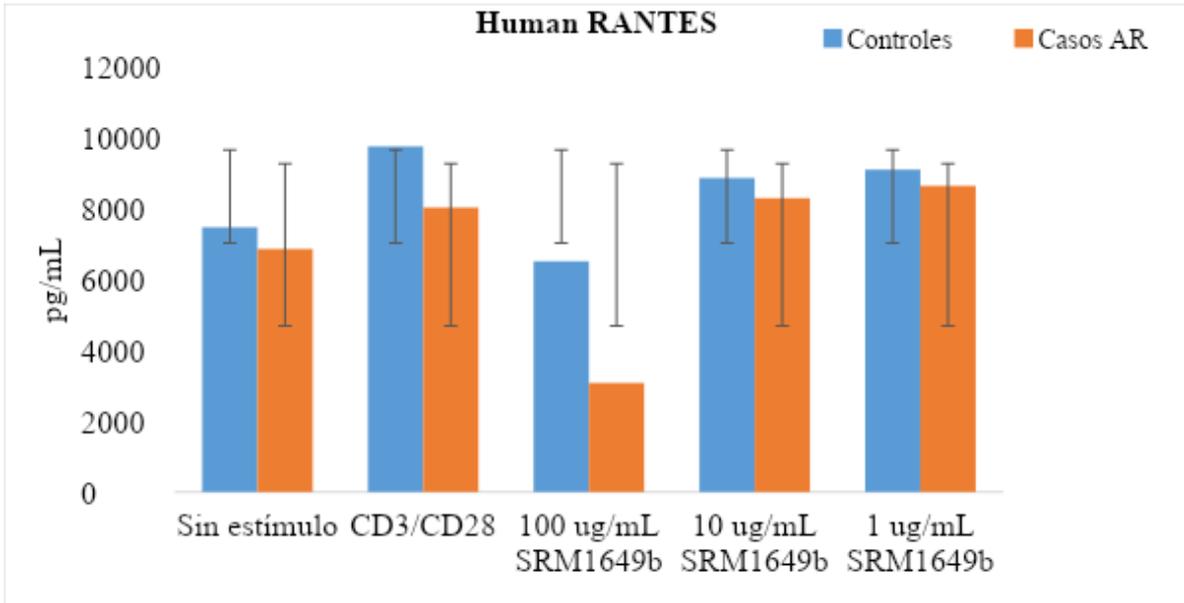
En el caso de las proteínas fosforiladas, las células que correspondían para lisado celular se estimularon bajo diferentes condiciones (Con presencia de LPS/PMA+ Ionomicina/Dynabeads CD3/CD28), después de obtener el lisado, se corrieron las muestras y

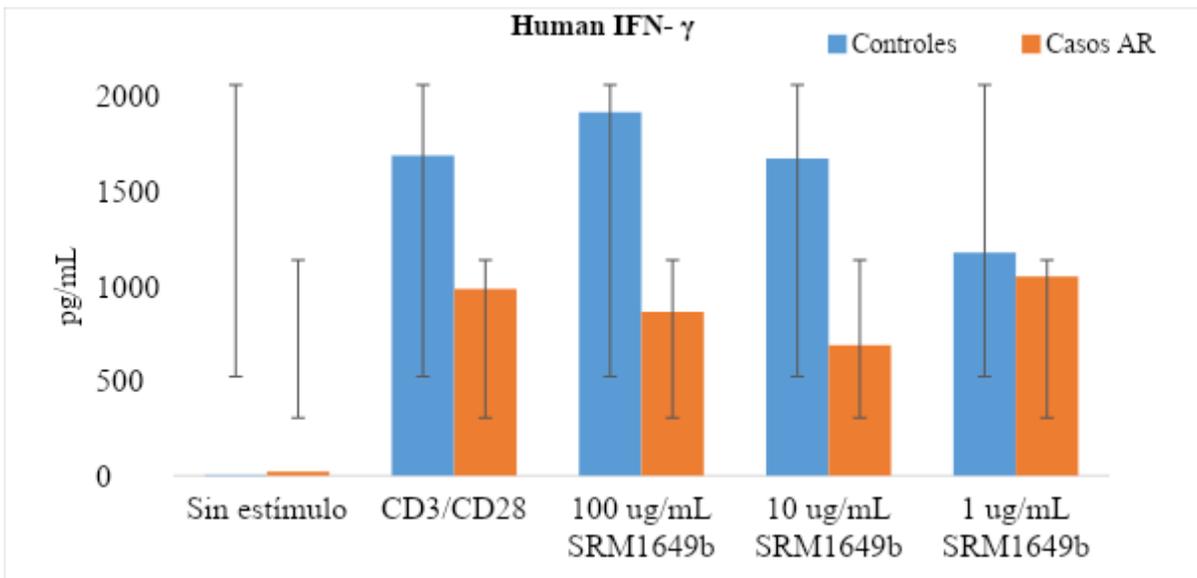
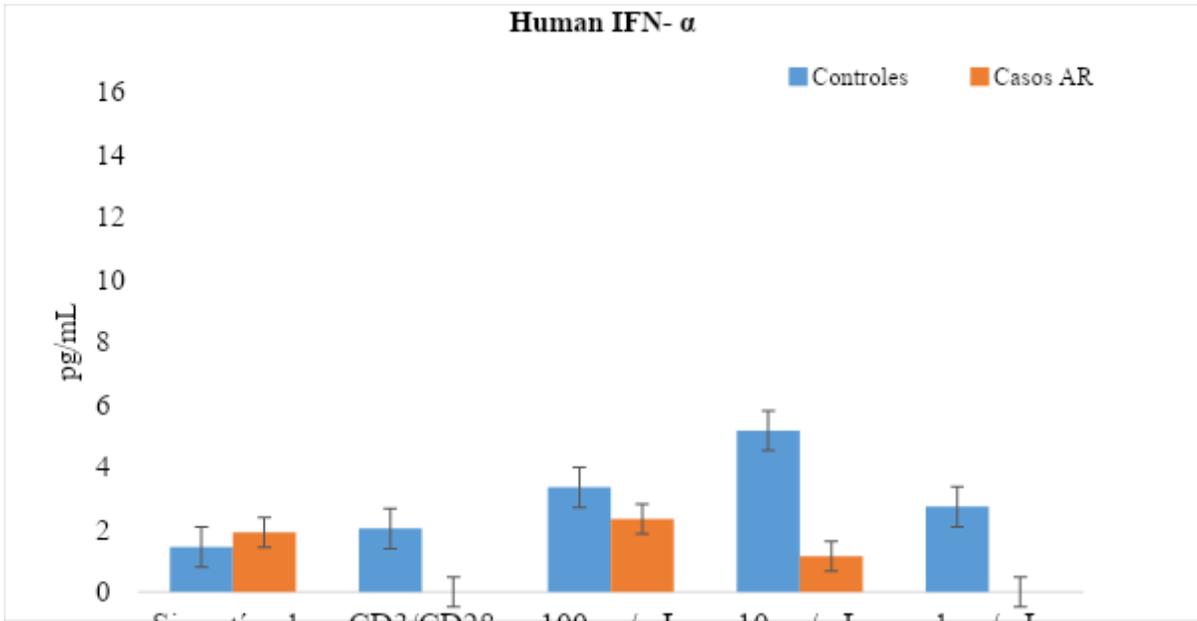
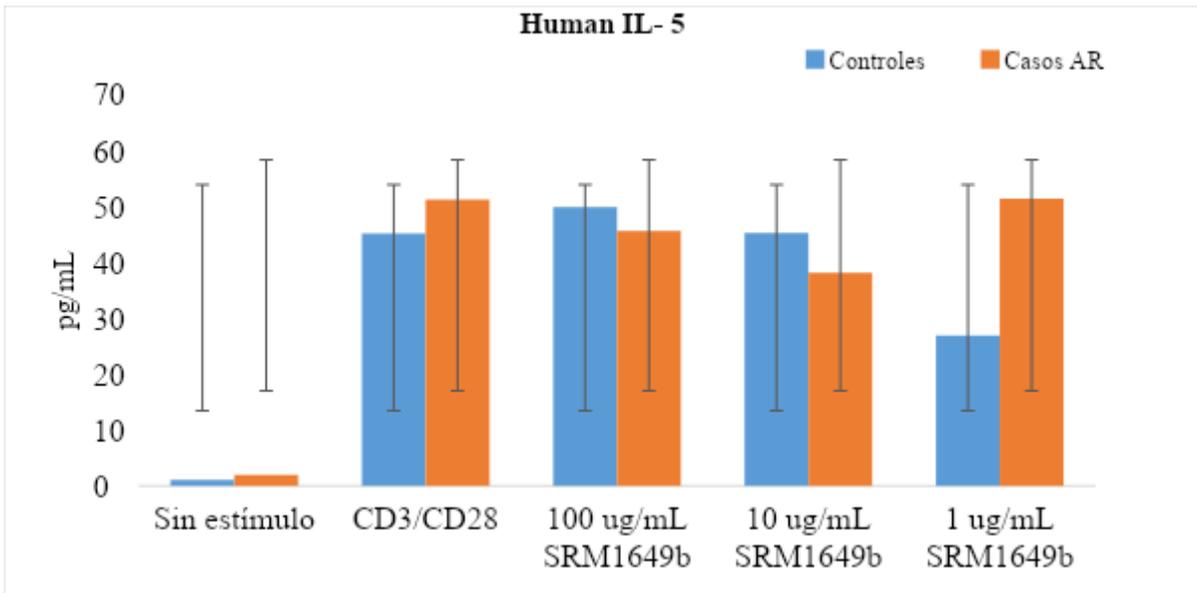
se incubaron con sus respectivos anticuerpos (Tanto para proteínas totales como para proteínas fosforiladas), como control positivo se utilizó un anticuerpo monoclonal de fosfotirosina que nos permitía evaluar si realmente los estímulos habían generado fosforilaciones dentro de las PBMC's, sin embargo, no se lograron visualizar las proteínas fosforiladas, sólo se observaban las proteínas totales, se presume que es necesario prolongar el tiempo de incubación en hielo de las células con el buffer de lisis y los inhibidores de proteasas y fosfatasas, además de resuspender continuamente el lisado para tener una mejor ruptura celular.

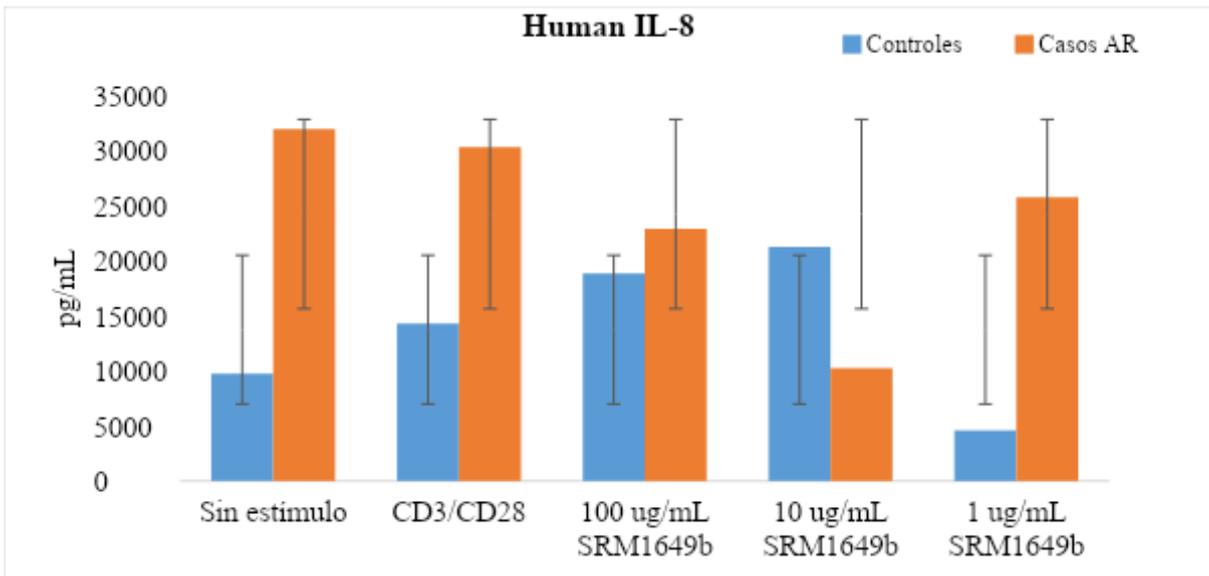
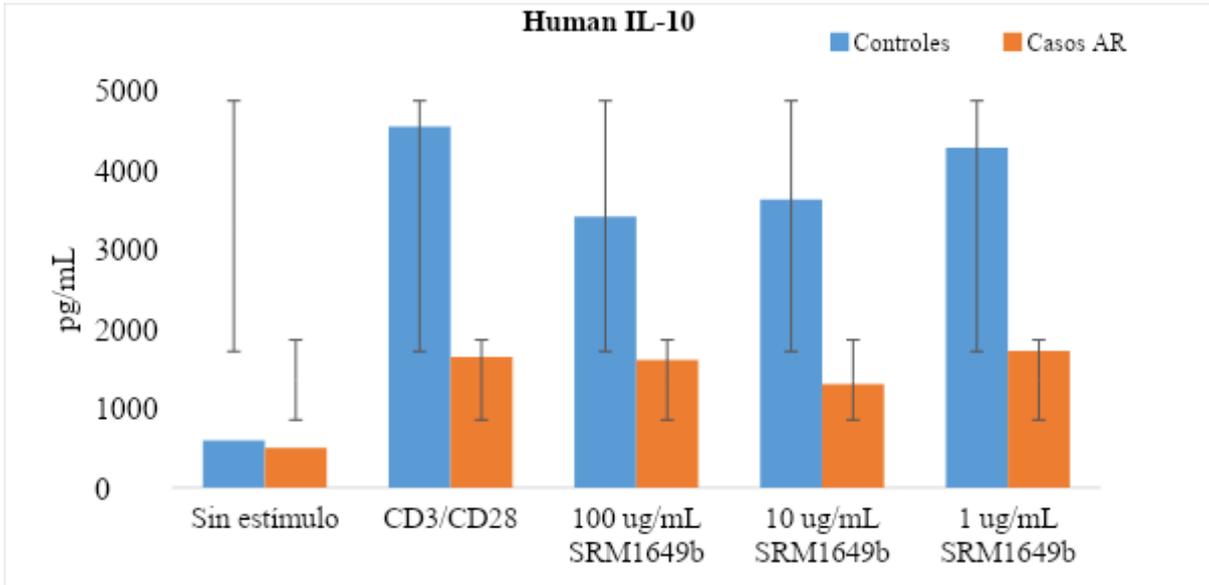
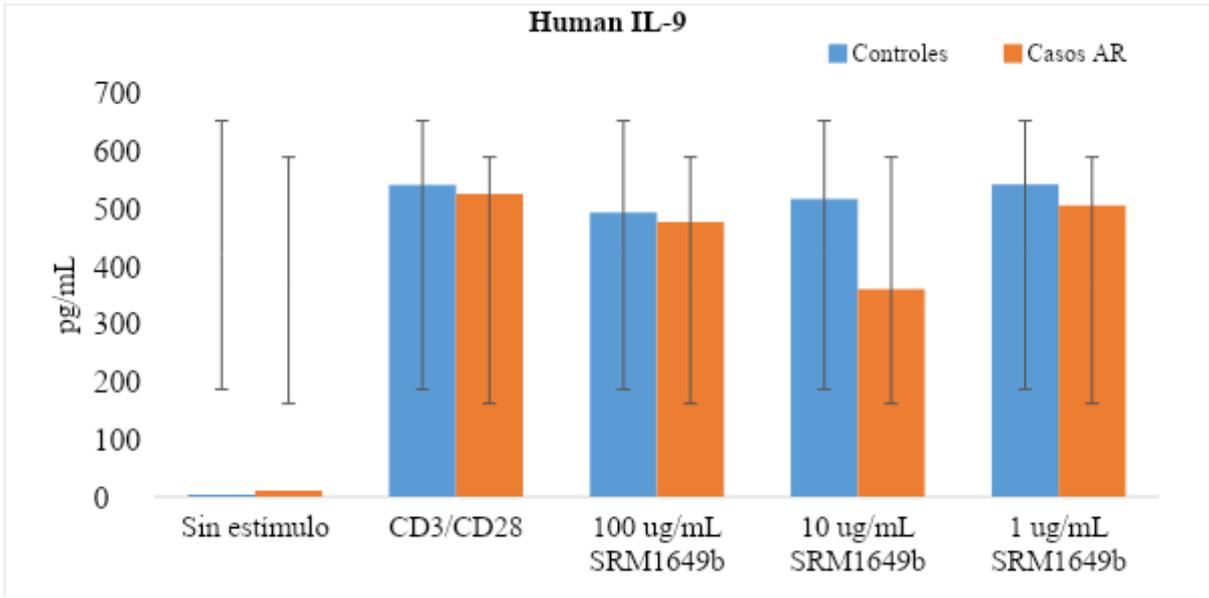
#### 4.6 Citoquinas

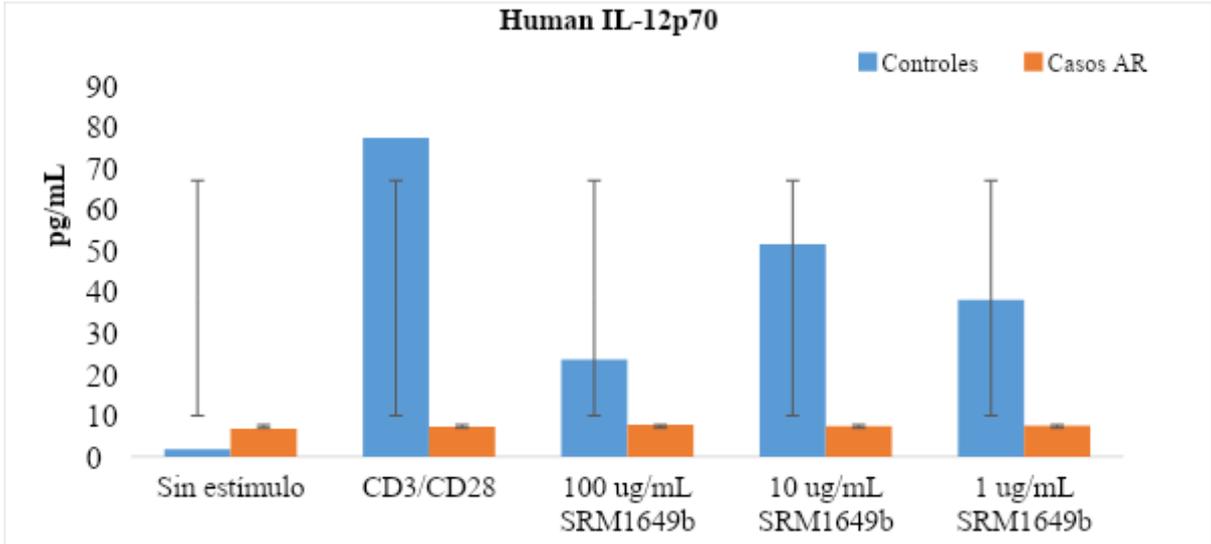
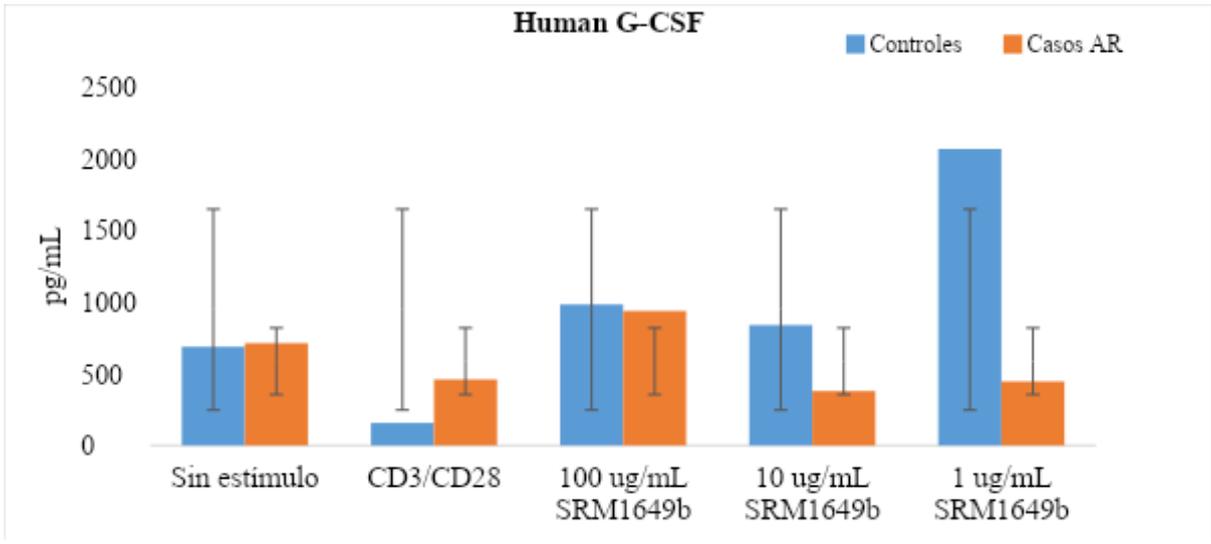
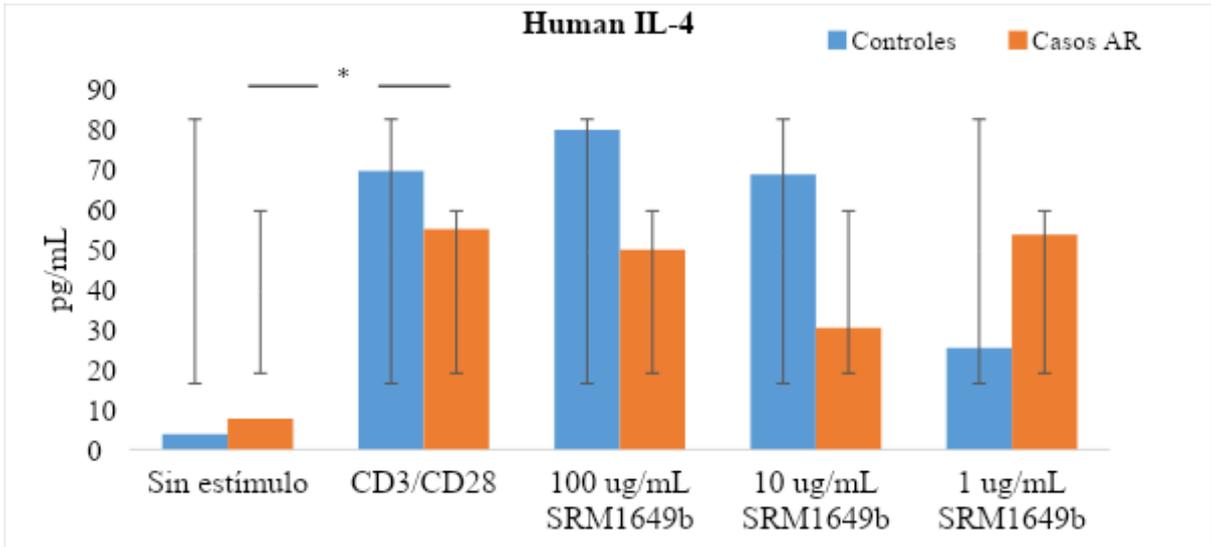
Se realizó la medición de las siguientes citoquinas IL-1B, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, MCP-1, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF y RANTES (pg/mL). Se recogieron los duplicados de las células de cada pozo ( $2 \times 10^6$  células) del ensayo con estímulo de 36h, se centrifugó a 700g por 10 minutos y se obtuvieron los sobrenadantes del cultivo, se midió por CBA los niveles de citoquinas. Los resultados que se muestran a continuación representan el promedio de 2 pacientes con AR y 2 pacientes control. Se determinó la desviación estándar de cada uno (Ver Anexo 2) y se realizó una prueba "t" student con las diferentes condiciones de los pacientes con AR. Se consideró significancia estadística sólo si  $p < 0.05$  (\*).

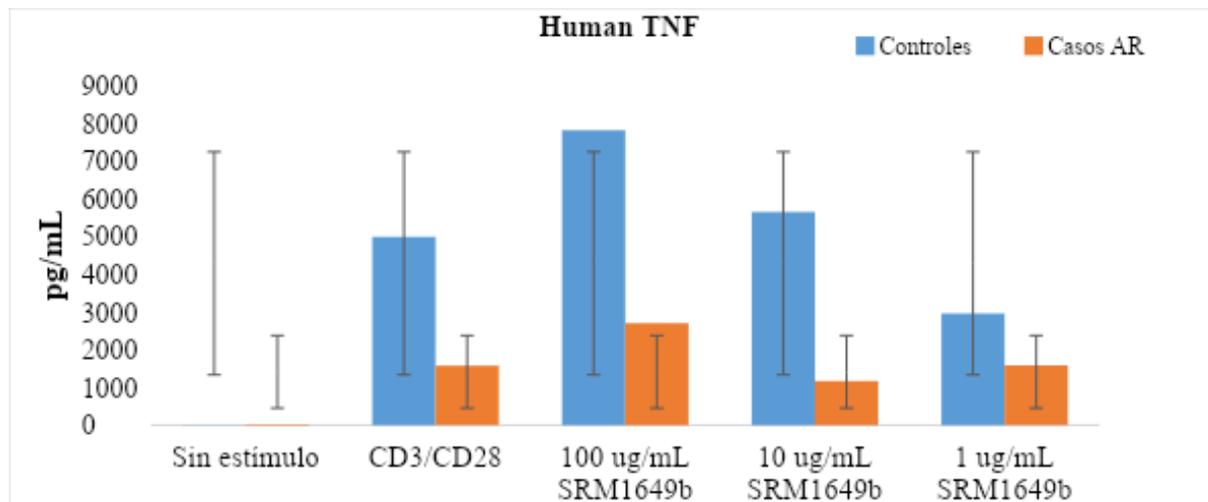
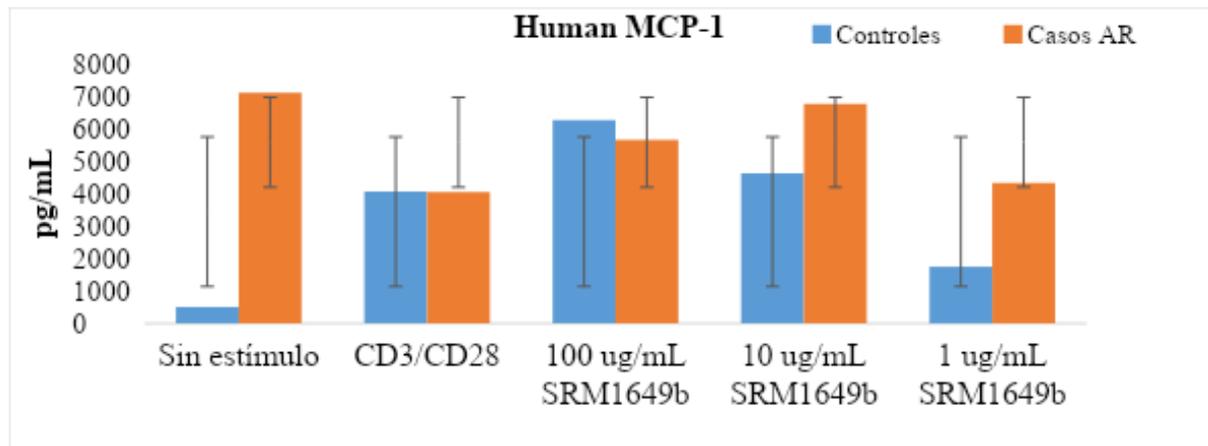
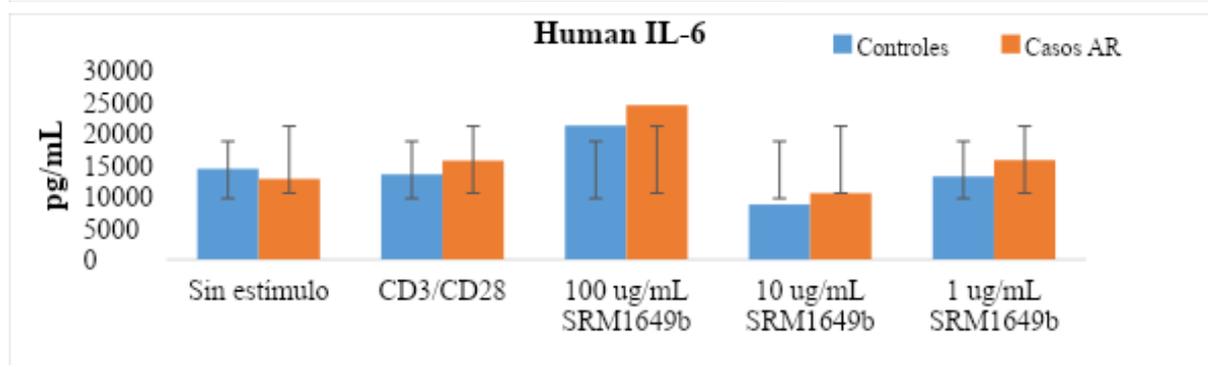
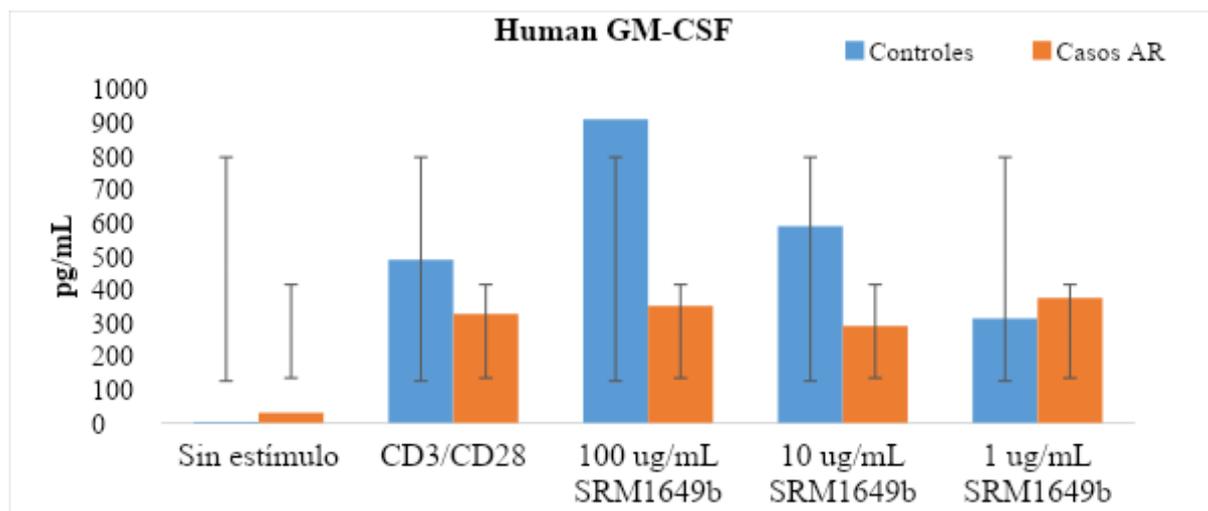


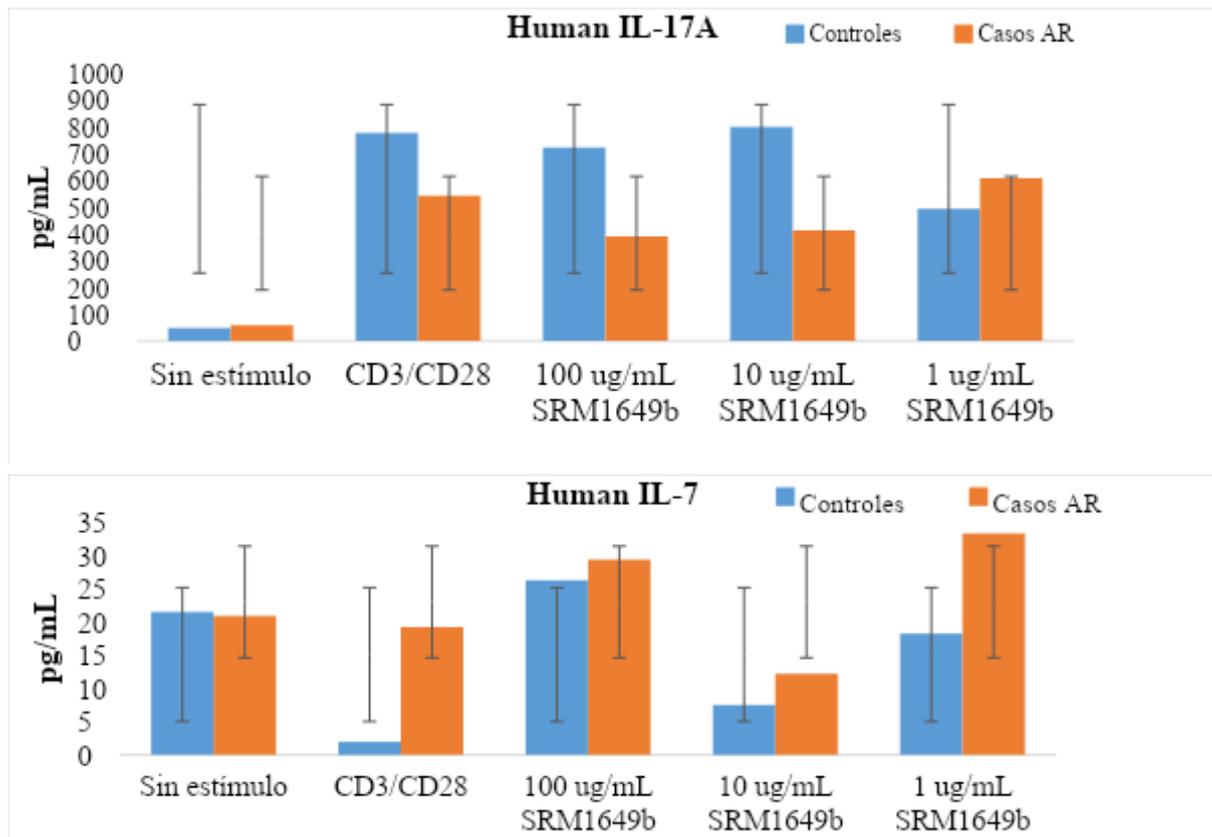












Con base a los resultados obtenidos por el ensayo CBA sólo se tuvieron dos cambios significativos estadísticamente y correspondían a la concentración de IL-4 e IL-13 de las PBMC's de los pacientes con artritis que no habían tenido estímulo, en comparación con las PBMC's de los pacientes con artritis que habían sido estimuladas sólo con CD3/CD28.

## 5. Discusión

Las enfermedades autoinmunes (EAI) son un problema de salud pública puesto que son crónicas e incurables, además están relacionadas con altos niveles de morbilidad y mortalidad (6,8) lamentablemente su origen aún se desconoce, pero se sabe que varios factores internos y externos influyen en su desarrollo, por lo tanto, la suma de estos factores y su interacción se conoce como exposoma (5) lo cual nos permite identificar de cierta forma cómo evolucionan estas enfermedades y cómo se genera la pérdida de la tolerancia inmunológica. En el caso específico de Artritis reumatoide, es una EAI sistémica, es decir afecta varios órganos y a medida que avanza, otras manifestaciones aparecen, inicialmente la patología comienza generando cambios inflamatorios del tejido sinovial de las articulaciones, del cartílago y del hueso, aunque también se presenta manifestaciones extraarticulares (EAM) en las se destaca

nodulosis, pleuritis, vasculitis cutánea, incluso ECV (56). Epidemiológicamente, AR tiene una distribución mundial que afecta a todas las razas. Sin embargo, afecta predominantemente a las mujeres con una proporción de sexos entre 2: 1 y 4: 1 (7,42,54) y la edad de inicio se sitúa comúnmente alrededor de los 30 años, no obstante, la AR se clasifica según la edad donde se desarrolla, es decir, AR con inicio de la enfermedad a edades > de 65 años se llama AR de inicio tardío (LORA), mientras que la AR que comienza a edades más tempranas (es decir, 17 - 65) se llama AR de inicio joven (YORA) (42). Uno de los factores de riesgo más asociados al desarrollo de AR, es la exposición al polvo urbano o a la contaminación atmosférica (10,13,14) que se relaciona conjuntamente con el aumento de la contaminación en la última década (11) teniendo en cuenta que las emisiones de diferentes compuestos de origen biológico y químico van en ascenso generando daños con grandes repercusiones, en especial en la salud humana (12).

El MP como uno de los agentes contaminantes más abundantes en el aire, tiene la capacidad de filtrarse en el tracto respiratorio, y permanecer en él, a pesar de ello las partículas con menor tamaño y diámetro aerodinámico tienen la capacidad de penetrar más a las ramificaciones del sistema respiratorio e incluso entrar en circulación sanguínea, inmunológicamente estas partículas generan múltiples efectos tanto en la respuesta innata como en la respuesta adaptativa (55), se han planteado diversas hipótesis en las que sugieren que el MP está estrechamente relacionado con la producción de estrés oxidativo, la disminución de metilación de macromoléculas, la inflamación local continua que promueve finalmente la inflamación sistémica y finalmente la formación de tejido linfoide inducible asociado a bronquios (iBALT) (33,35,36) todo esto centrándose en generar ambientes proinflamatorios que opacan la actividad de poblaciones celulares que regulan estos procesos. Aunque se desconoce específicamente qué componentes del MP se unen como ligando al receptor de hidrocarburos arilo (AhR)(37) , se ha evidenciado que la activación de este factor de transcripción influye en una polarización proinflamatoria de la respuesta inmune adaptativa, promoviendo una marcada presencia de la población de LTh17, esta población de linfocitos se encuentra principalmente en mucosas de tejido pulmonar y son capaces de producir IL-17A, IL-6, IL-9, TNF entre otros, amplificando una respuesta inflamatoria (3,4,7), asimismo, la marcada presencia de LTh17 se ha relacionado con una disminución de LTreg FOXP3+ (33), células indispensables en la tolerancia inmunológica, puesto que son las encargadas de contrarrestar el ambiente inflamatorio por distintos mecanismos como: la

liberación de Adenosina, IL-10, IL-35 Y TGF beta, modulando la función de las células dendríticas a través del receptor inhibitor CTLA-4 para inducir la producción de una enzima indolamina deoxigenasa (IDO) que inhibe la activación de LT efectores, entre otros (2,3,4).

La referencia estándar SRM1649b es la referencia que más se asemeja al polvo urbano, puesto que está compuesta de varios hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP), además de nitro HAP, congéneres de bifenilos policlorados (PCB), plaguicidas clorados y constituyentes inorgánicos en la atmósfera, según la literatura (53,54) esta referencia podría generar efectos en la respuesta inmune tanto innata como adaptativa en un rango de concentración de 1 ug/mL a 100 ug/mL es por eso que en la presente investigación, se expusieron las PBMC's tanto de pacientes control como de pacientes con AR a diferentes concentraciones del contaminante con el fin de identificar los cambios extracelulares asociados a muerte celular y cambios intracelulares asociados a la activación de vías de señalización generalmente implicadas en desórdenes inmunológicos.

Especialmente en AR, las células efectoras Th1 y Th17 (37) sobresalen en comparación de otras poblaciones de LT CD4+ como Th2 o Th9. En el ensayo de CBA se quiso determinar las citoquinas asociadas a poblaciones de linfocitos efectoras T CD4+, en el caso de linfocitos Th1 se midió IFN gamma, para linfocitos Th2 IL-4, IL-5, IL-9, IL- 10 e IL-13 y finalmente para linfocitos Th17 IL-17A, IL-6 y TNF alfa; las otras citoquinas analizadas no estaban relacionadas directamente con una población de LT pero si con procesos de inflamación local y sistémica, no obstante, realizando la prueba "t" de student para cada resultado obtenido de las concentraciones de las citoquinas tanto de pacientes control como de pacientes con AR, sólo hubo dos significancias estadísticas en pacientes con AR que resaltaron en el ensayo y se relacionaban con IL-4 e IL-13, citoquinas vinculadas con población de LTh2 y producción de inmunoglobulina E (IgE), pese a tener estos resultados, el aumento de la concentración de las citoquinas mencionadas sólo se observaron en las células con presencia del mitógeno CD3/CD28 y no bajo la presencia del contaminante como se esperaba.

Entre los objetivos claves de esta investigación se quiso evaluar el efecto del material particulado en la viabilidad de las células de pacientes con artritis reumatoide, a pesar de que se hicieron varios ensayos de viabilidad y citotoxicidad (Ensayo de exclusión de Azul de

tripán, ensayo de viabilidad por citometría de flujo y MTT) con las diferentes concentraciones que sugería la literatura, no se vieron cambios relacionados a la disminución de viabilidad celular o la inducción de apoptosis tardía o temprana de las PBMC's infiriendo que el contaminante no afecta las células viables, sin embargo, se recomendaría realizar los ensayos nuevamente con concentraciones mucho más elevadas para rectificar si realmente el contaminante ejerce o no un efecto tóxico o letal en las PBMC's.

Al no observar cambios extracelulares en las células tras la exposición del agente contaminante y no ver cambios significativos en la síntesis de citoquinas asociadas a determinadas poblaciones celulares o a la polarización de un ambiente inflamatorio, es imprescindible identificar si se están generando cambios intracelulares, estudiando la activación de diferentes vías de señalización, el western blot como técnica molecular para identificación de proteínas era el ensayo ideal para estudiar estos cambios intracelulares, se proponía determinar la participación de las rutas de señalización a partir del reconocimiento de proteínas específicas, una de las rutas asociadas a la inflamación era la ruta MAPK/ERK, donde se pretendía distinguir a MEK y ERK 2 totales y fosforiladas, ya que la fosforilación específica de estas células permitirían determinar la activación de esta ruta.

Otra ruta con un papel esencial en autoinmunidad e inflamación es la ruta JAK-STAT, para evaluar su activación se reconocería AKT total y fosforilada, indicativo de la activación de mTOR (Diana de rapamicina en células de mamífero) proteína implicada en el crecimiento, la supervivencia y la proliferación celular (56), en el caso de JNK1 esta proteína está relacionada con apoptosis, neurodegeneración, diferenciación y proliferación celular, condiciones inflamatorias y producción de citocinas a partir de la activación del factor de transcripción AP-1.

Sin embargo para realizar estos ensayos es indispensable estandarizar las condiciones del Western blot, especialmente para las proteínas fosforiladas ya que se encuentran en menor proporción; logrado esto, se podrá analizar casos de AR u otra EAI y ver específicamente la acción de los contaminantes en los cambios intracelulares, no obstante es importante resaltar que esta investigación es un investigación piloto y servirá como base para la implementación de nuevos ensayos o la modificación de los mismos.

## 6. Conclusiones

- Se estandarizó las condiciones específicas para las proteínas totales de western blot en PBMC's de pacientes control
- Se evaluó el efecto de la referencia estándar SRM1649b en la viabilidad de las células de pacientes control y casos de AR, determinando que para las concentraciones empleadas el contaminante no afecta la viabilidad celular
- Se expusieron PBMC's de casos de AR y controles con diferentes estimulantes *in vitro* para evaluar si existía una relación con la síntesis de citoquinas pro y anti inflamatorias estableciendo que no había una relación de un ambiente inflamatorio en casos y controles a determinadas concentraciones de la referencia estándar SRM1649b

### 6.1 Referencias Bibliográficas

1. Paul W, Fathman C, Metzger H. Annual review of immunology. Palo Alto, Calif.: Annual Reviews Inc.; 1994.
2. Jadue A. N, González AI Inmunopatogénesis de enfermedades autoinmunes. Revista Médica Clínica Las Condes [Internet]. 2012 [citado 13 de Marzo de 2020]; 23: 462-472. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(12\)70337-1](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70337-1)
3. Kokuina Elena. De la autoinmunidad a las enfermedades autoinmunes. Rev cubana med [Internet]. 2001 Mar [citado 13 de Marzo de 2020 ] ; 40( 1 ): 36-44. Disponible en:[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75232001000100006&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232001000100006&lng=es).
4. Anaya J, Shoenfeld Y, Correa P, García-Carrasco M, Cervera R. Autoinmunidad y Enfermedad Autoinmune. 1st ed. Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB); 2005.

5. Anaya J, Jiménez P, Ramírez Santana C. The autoimmune ecology: an update. Wolters Kluwer Health [Internet]. 2018 [citado 15 de Marzo de 2020]; 30. Disponible en: <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000498>
6. Anaya J, Rojas- Villarraga A. La Tautología autoinmune. Bogotá: Universidad del Rosario; 2012.
7. Sex Differences in Autoimmune Disease from a Pathological Perspective Fairweather, DeLisa et al. The American Journal of Pathology, Volume 173, Issue 3, 600 - 609; 2008.
8. Missoum H. et al Prevalence of autoimmune diseases and clinical significance of autoantibody profile: Data from National Institute of Hygiene in Rabat, Morocco [Internet]. Science Direct. 2019 [citado 17 de Marzo de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2019.02.012>
9. Cooper G, Bynum M, Somers E. Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: Improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases [Internet]. Science Direct. 2009 [citado 17 de Marzo 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.09.008>
10. Miller F. et al, Epidemiology of environmental exposures and human autoimmune diseases: Findings from a National Institute of Environmental Health Sciences Expert Panel Workshop [Internet]. Science Direct. 2012 [citado 17 de Marzo de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.05.002>
11. Vargas Marcos F. LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL COMO FACTOR DETERMINANTE DE LA SALUD [Internet]. SciELO Salud Pública. 2005 [citado 22 de Marzo de 2020]. Disponible en: <https://doi:10.1590/S1135-57272005000200001>
12. Rosales Castillo J, Torres Meza V, Olaiz Fernández G, Borja Aburto V. Los efectos agudos de la contaminación del aire en la salud de la población: evidencias de estudios epidemiológicos [Internet]. SciELO Salud Pública. 2001 [citado 22 de Marzo de 2020]. Disponible en: <https://doi:10.1590/S0036-36342001000600005>
13. Stieb D, Szyszkowicz M, H Rowe B, Leech J. Air pollution and emergency department visits for cardiac and respiratory conditions: a multi-city time-series analysis [Internet]. BMC BioMed Central. 2009 [citado 22 de Marzo de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1476-069X-8-25>

14. VALAVANIDIS, A., FIOTAKIS, K. and VLACHOGIANNI, T., 2008. Airborne Particulate Matter and Human Health: Toxicological Assessment and Importance of Size and Composition of Particles for Oxidative Damage and Carcinogenic Mechanisms. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 26(4), pp.339-362.
15. Anderson, J., Thundiyil, J. and Stolbach, A., 2011. Clearing the Air: A Review of the Effects of Particulate Matter Air Pollution on Human Health. *Journal of Medical Toxicology*, 8(2), pp.166-175.
16. Gómez Mejiba S, Zhai Z, Akram H, Pye Q, Hensley K. Inhalation of Environmental Stressors & Chronic Inflammation: Autoimmunity and Neurodegeneration [Internet]. National institute of health. 2008 [citado 10 de Abril de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.016>
17. Folkerts G, Kloek J, Muijsers R, Nijkamp F. Reactive nitrogen and oxygen species in airway inflammation [Internet]. Science Direct. 2020 [citado 10 de Abril 2020]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01324-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01324-3)
18. Kelly F, Fussell J. Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter [Internet]. Atmospheric Environment. 2012 [citado 10 de Abril de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.06.039>
19. Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Fiotakis, K. and Loridas, S., 2013. Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer: Respirable Particulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis through Reactive Oxygen Species Mechanisms. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(9), pp.3886-3907.
20. Ling L, Terrence R, Marry D, Mieczyslaw S, Hongyu Y, Raymond P et al. Influence of Personal Exposure to Particulate Air Pollution on Cardiovascular Physiology and Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in Subjects With Diabetes [Internet]. Journal of Occupational and Environmental Medicine. 2007 [citado 10 de Abril de 2020]. Disponible en: <https://doi:10.1097/JOM.0b013e31803220ef>
21. Nemmar A, Hoet P, Vanquickenborne B, Dinsdale D. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans [Internet]. Circulation. 2002 [citado 15 de Abril de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1161/hc0402.104118>

22. Calderón Garcidueñas L. et al, Systemic Inflammation, Endothelial Dysfunction, and Activation in Clinically Healthy Children Exposed to Air Pollutants [Internet]. Taylor & Francis Online. 2008 [citado 15 de Abril de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/08958370701864797>
23. Pfau J, Sentissi J, Li S, Calderon Garcidueñas L, Brown J, Blake D. Asbestos-Induced Autoimmunity in C57Bl/6 Mice [Internet]. Taylor & Francis Online. 2006 [citado 15 de Abril de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/15476910802085756>
24. Bernatsky S. et al, Fine particulate air pollution, nitrogen dioxide, and systemic autoimmune rheumatic disease in Calgary, Alberta [Internet]. Science Direct. 2015 [citado 20 de Abril de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.05.007>
25. Ohtsuka Y. Genetic Linkage Analysis of Susceptibility to Particle Exposure in Mice [Internet]. ATS Journals. 1999 [citado 20 de Abril de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.22.5.3895>
26. Bernatsky S. et al, Industrial air emissions, and proximity to major industrial emitters, are associated with anti-citrullinated protein antibodies [Internet]. Science Direct. 2017 [citado 20 de Abril de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.04.035>
27. Close K.D. Deane, C.I. O'Donnell, W. Hueber, D.S. Majka, A.A. Lazar, L.A. Derber, W.R. Gilliland, J.D. Edison, J.M. Norris, W.H. Robinson and V.M. Holers. The number of elevated cytokines/chemokines in pre-clinical seropositive rheumatoid arthritis predicts time to diagnosis in an age-dependent manner [Internet]. National Institute of Health. 2020 [citado 24 de Abril de 2020]. Disponible en: <https://doi:10.1002/art.27638>
28. Pierdominici M, Maselli A, Cecchetti S, Tinari A, Mastrofrancesco A, Alfe M, et al. Diesel exhaust particle exposure in vitro impacts T lymphocyte phenotype and function [Internet]. BMC BioMed Central. 2014 [citado 24 de Abril de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12989-014-0074-0>
29. Yun Ma Q, Yu Huang D, Jun Zhang H, Wang S, Chen X. Exposure to particulate matter 2.5 (PM2.5) induced macrophage-dependent inflammation, characterized by increased Th1/Th17 cytokine secretion and cytotoxicity [Internet]. Science Direct.

- 2017 [citado 24 de Abril de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.06.019>
30. Deiuliis J, Kampfrath T, Zhong J. Pulmonary, et al. T cell activation in response to chronic particulate air pollution [Internet]. American physiological society. 2012 [citado 13 de Mayo de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00261.2011>
31. Williams M, Rangasamy T, Bauer S. et al. Disruption of the Transcription Factor Nrf2 Promotes Pro-Oxidative Dendritic Cells That Stimulate Th2-Like Immuno-responsiveness upon Activation by Ambient Particulate Matter [Internet]. The Journal of Immunology. 2008 [citado 13 de Mayo de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.7.4545>
32. Stark M, Ley K, Olson T. et al. Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17 [Internet]. Science Direct. 2005 [citado 20 de Junio de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.01.011>
33. Zhao C, Xu Z, Wu G. et al. Emerging role of air pollution in autoimmune diseases [Internet]. Science Direct. 2019 [citado 20 de Junio de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.12.010>
34. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function [Internet]. American physiological society. 2002 [citado 20 de Junio de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
35. Wu W, Jin Y, Carlsten C. Inflammatory health effects of indoor and outdoor particulate matter [Internet]. Science Direct. 2018 [citado 20 de Junio de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.12.981>
36. O'Driscoll C, Owens L, Gallo M. Differential effects of diesel exhaust particles on T cell differentiation and autoimmune disease [Internet]. Particle and Fibre Toxicology. 2018 [citado 9 de Julio de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0271-3>
37. Sigaux J, Biton J, Andre E, Semerano L, Boissier MC. Air pollution as a determinant of rheumatoid arthritis [Internet]. Science Direct. 2019 [citado 9 de Julio de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2018.03.001>
38. ARCINIÉGAS SUÁREZ CÉSAR AUGUSTO. DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE MATERIAL PARTICULADO: PARTÍCULAS SUSPENDIDAS TOTALES Y

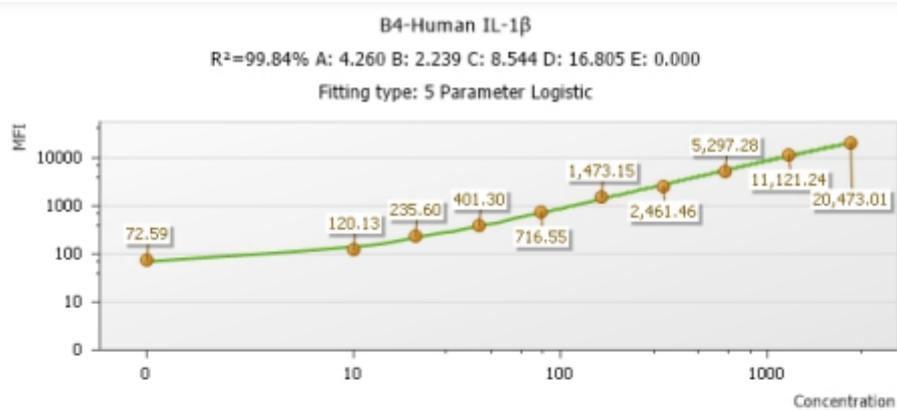
FRACCIÓN RESPIRABLE PM10. Luna Azul [Internet]. 2012 June [citado 20 de Octubre de 2020]; (34):195-213. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1909-24742012000100012&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-24742012000100012&lng=en).

39. M. Steenhof , I. Gosens , M. Strak , et al. In vitro toxicity of particulate matter (PM) collected at different sites in the Netherlands is associated with PM composition, size fraction and oxidative potential - the RAPTES project [Internet]. Particle and Fibre Toxicology. 2011 [citado 20 de Octubre 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1743-8977-8-26>
40. O'Driscoll C and Mezrich J. The Aryl Hydrocarbon Receptor as an Immune-Modulator of Atmospheric Particulate Matter-Mediated Autoimmunity [Internet]. Frontiers in immunology. 2018 [citado 25 Octubre de 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02833>
41. MacNee W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease [Internet]. Science Direct. 2020 [citado 1 de Noviembre de 2020]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01320-6](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01320-6)
42. Anaya J, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, Levy R, Cervera R. Autoimmunity From Bench to Bedside. 1st ed. Bogotá: El Rosario University Press; 2013.
43. Firestein G, McInnes I. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis [Internet]. Science Direct. 2017 [citado 2 de Noviembre 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.006>
44. Congreso de Colombia. Ley 1392 de 2010 [Internet]. Instituto Nacional de Salud. 2010 [citado 3 de Noviembre de 2020]. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/Normatividad/Leyes/LEY%201392%20DE%202010.pdf>
45. Ministerio de Salud y Protección social. Decreto 1954 de 2012 [Internet]. Ministerio de Salud. 2012 [citado 3 de Noviembre 2020]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/Decreto-1954-de-2012.PDF>
46. Ministerio de Protección y salud social. Resolución 2048 del 2015 [Internet]. Ministerio de Salud. 2015 [citado 3 de Noviembre 2020]. Disponible en: [https://www.minsalud.gov.co/Normatividad\\_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%202048%20de%202015.pdf](https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%202048%20de%202015.pdf)

47. Ministerio de Protección y salud social. Resolución 5265 del 2018 [Internet]. Ministerio de Salud. 2018 [citado 3 de Noviembre 2020]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-5265-de-2018.pdf>
48. Ministerio de Protección y salud social. Resolución 946 del 2019 [Internet]. Ministerio de Salud. 2019 [citado 3 de Noviembre 2020]. Disponible en: [https://www.minsalud.gov.co/Normatividad\\_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%20No.%20946%20de%202019.pdf](https://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Resoluci%C3%B3n%20No.%20946%20de%202019.pdf)
49. Manzini JL. DECLARACIÓN DE HELSINKI: PRINCIPIOS ÉTICOS PARA LA INVESTIGACIÓN. 2000;321–34.
50. Muller- HK. Mechanisms of Ageing and Development, 28 (1984) 47-55. 1984; 28:47–55.
51. Pacheco Y, Barahona-Correa J, Monsalve DM, Acosta-Ampudia Y, Rojas M, Rodríguez Y, et al. Cytokine and autoantibody clusters interaction in systemic lupus erythematosus. J Transl Med. 2017;15(1):1–15
52. Tanaka, Y., 2021. A review of upadacitinib in rheumatoid arthritis. [internet] Taylor & Francis. [citado 10 de Julio 2021] Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14397595.2020.1782049>
53. Sehra G. Diesel Exhaust Particles and Macrophage Function: Relevance to COPD. National Heart and Lung Institute, Imperial College London [Internet]. 2013 [citado 20 Agosto 2021]. Disponible en : <https://core.ac.uk/download/pdf/76989997.pdf>
54. Jantzen K. *et al.*, Oxidative damage to DNA by diesel exhaust particle exposure in co-cultures of human lung epithelial cells and macrophages [Internet]. Mutagenesis. 2012 [citado 25 agosto 2021]. Disponible en: <https://academic.oup.com/mutage/article/27/6/693/1066751>
55. Voorhis M. *et al.*, Exposure to Atmospheric Particulate Matter Enhances Th17 Polarization through the Aryl Hydrocarbon Receptor [Internet]. PLOS ONE. 2013 [citado 5 Septiembre 2021]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0082545>
56. Harrison D. The JAK/STAT Pathway [Internet]. NCBI. 2012 [citado 10 September 2021]. Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3282412/>

## 7. Anexos

### Anexo 1. Curvas de calibración de citoquinas

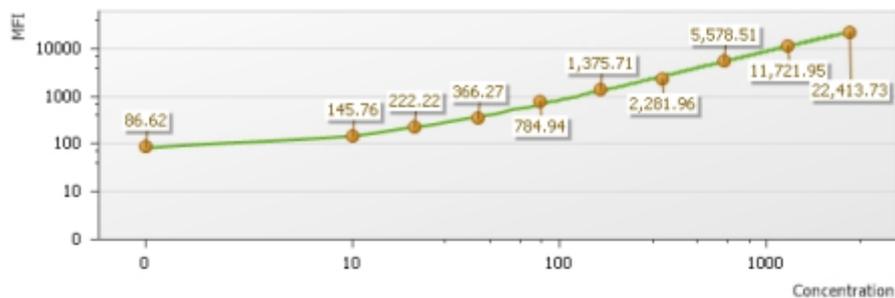


Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	422	72.59	134.44	183.78 %	0.00 pg/mL	0.70 pg/mL	0.00 %
Std002	401	120.13	102.72	79.41 %	10.00 pg/mL	7.31 pg/mL	73.06 %
Std003	424	235.60	172.45	65.55 %	20.00 pg/mL	22.00 pg/mL	110.02 %
Std004	404	401.30	207.97	50.04 %	40.00 pg/mL	42.55 pg/mL	106.38 %
Std005	396	716.55	245.29	34.97 %	80.00 pg/mL	80.42 pg/mL	100.52 %
Std006	363	1,473.15	373.30	25.65 %	156.00 pg/mL	168.11 pg/mL	107.76 %
Std007	405	2,461.46	782.04	28.11 %	312.50 pg/mL	280.31 pg/mL	89.70 %
Std008	399	5,297.28	1,452.16	28.89 %	625.00 pg/mL	603.13 pg/mL	96.50 %
Std009	413	11,121.24	2,226.70	22.13 %	1,250.00 pg/mL	1,298.80 pg/mL	103.90 %
Std010	374	20,473.01	5,108.43	22.61 %	2,500.00 pg/mL	2,529.46 pg/mL	101.18 %

D4-Human RANTES

R<sup>2</sup>=99.85% A: 4.452 B: 2.319 C: 9.234 D: 18.205 E: 0.000

Fitting type: 5 Parameter Logistic

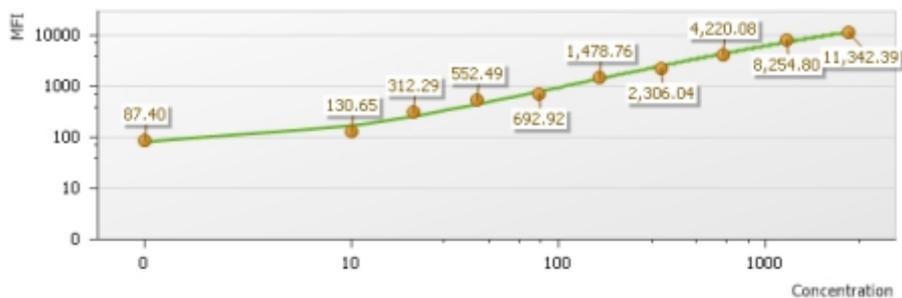


Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	420	86.62	125.35	149.79 %	0.00 pg/mL	0.49 pg/mL	0.00 %
Std002	432	145.76	90.91	65.49 %	10.00 pg/mL	9.03 pg/mL	90.34 %
Std003	377	222.22	137.21	56.15 %	20.00 pg/mL	19.29 pg/mL	96.43 %
Std004	419	366.27	175.38	47.54 %	40.00 pg/mL	38.38 pg/mL	95.96 %
Std005	396	784.94	232.22	31.06 %	80.00 pg/mL	91.77 pg/mL	114.71 %
Std006	404	1,375.71	319.15	22.66 %	156.00 pg/mL	163.40 pg/mL	104.74 %
Std007	343	2,281.96	629.87	25.70 %	312.50 pg/mL	268.71 pg/mL	85.99 %
Std008	413	5,578.51	1,192.39	22.18 %	625.00 pg/mL	634.22 pg/mL	101.48 %
Std009	384	11,721.95	2,685.09	26.29 %	1,250.00 pg/mL	1,300.69 pg/mL	104.06 %
Std010	367	22,413.73	5,648.20	23.88 %	2,500.00 pg/mL	2,482.83 pg/mL	99.31 %

E6-Human IL-13

R<sup>2</sup>=99.24% A: 4.432 B: 2.251 C: 7.111 D: 13.345 E: 0.000

Fitting type: 5 Parameter Logistic

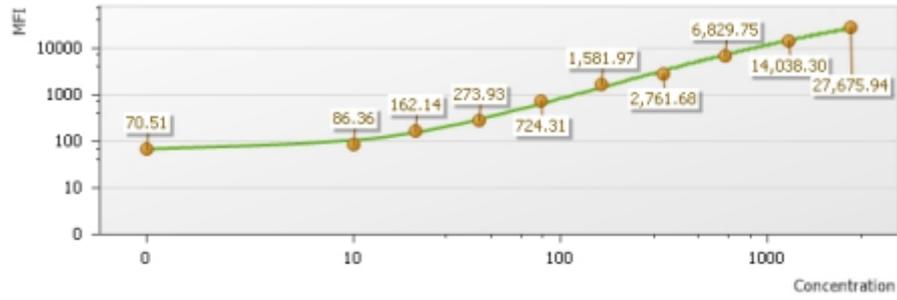


Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	489	87.40	135.91	139.22 %	0.00 pg/mL	0.88 pg/mL	0.00 %
Std002	452	130.65	98.85	70.18 %	10.00 pg/mL	5.76 pg/mL	57.64 %
Std003	461	312.29	171.49	57.08 %	20.00 pg/mL	24.99 pg/mL	124.96 %
Std004	464	552.49	250.36	48.19 %	40.00 pg/mL	51.44 pg/mL	128.59 %
Std005	427	692.92	277.72	45.04 %	80.00 pg/mL	67.42 pg/mL	84.27 %
Std006	506	1,478.76	545.41	35.74 %	156.00 pg/mL	163.73 pg/mL	104.95 %
Std007	475	2,306.04	1,087.13	44.27 %	312.50 pg/mL	277.51 pg/mL	88.80 %
Std008	458	4,220.08	1,605.14	40.95 %	625.00 pg/mL	589.08 pg/mL	94.25 %
Std009	460	8,254.80	3,695.48	43.46 %	1,250.00 pg/mL	1,475.55 pg/mL	118.04 %
Std010	442	11,342.39	7,569.75	47.63 %	2,500.00 pg/mL	2,384.23 pg/mL	95.37 %

A4-Human IL-2

R<sup>2</sup>=99.74% A: 4.183 B: 3.068 C: 6.292 D: 13.235 E: 0.000

Fitting type: 5 Parameter Logistic

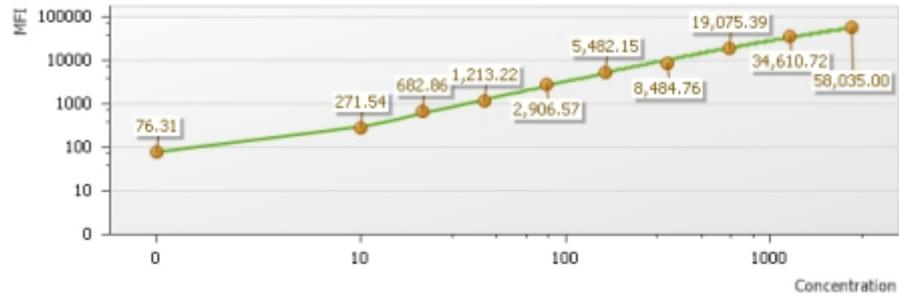


Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	536	70.51	120.63	181.18 %	0.00 pg/mL	2.71 pg/mL	0.00 %
Std002	581	86.36	88.22	106.41 %	10.00 pg/mL	6.66 pg/mL	66.63 %
Std003	608	162.14	144.84	91.49 %	20.00 pg/mL	20.64 pg/mL	103.21 %
Std004	572	273.93	174.79	67.42 %	40.00 pg/mL	37.34 pg/mL	93.36 %
Std005	570	724.31	207.00	27.27 %	80.00 pg/mL	90.37 pg/mL	112.96 %
Std006	532	1,581.97	356.16	23.48 %	156.00 pg/mL	172.23 pg/mL	110.41 %
Std007	542	2,761.68	705.57	23.37 %	312.50 pg/mL	272.82 pg/mL	87.30 %
Std008	590	6,829.75	1,390.61	21.15 %	625.00 pg/mL	601.91 pg/mL	96.31 %
Std009	541	14,038.30	2,695.36	19.88 %	1,250.00 pg/mL	1,225.52 pg/mL	98.04 %
Std010	534	27,675.94	7,039.59	23.19 %	2,500.00 pg/mL	2,698.15 pg/mL	107.93 %

A6-Human IL-5

R<sup>2</sup>=99.80% A: 4.327 B: 1.890 C: 6.877 D: 16.120 E: 0.000

Fitting type: 5 Parameter Logistic

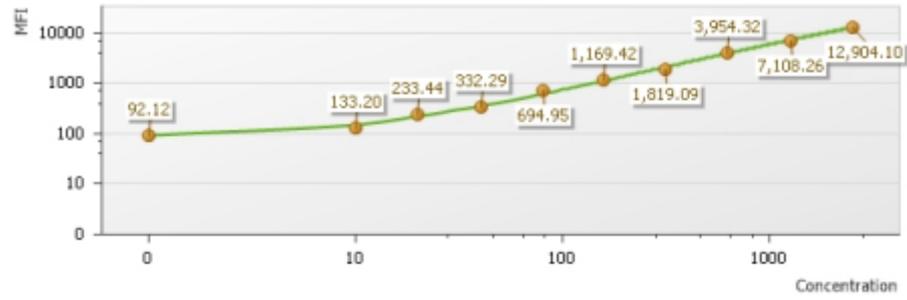


Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	339	76.31	115.38	163.28 %	0.00 pg/mL	0.15 pg/mL	0.00 %
Std002	325	271.54	172.78	60.67 %	10.00 pg/mL	8.52 pg/mL	85.22 %
Std003	353	682.86	276.15	44.31 %	20.00 pg/mL	22.43 pg/mL	112.17 %
Std004	324	1,213.22	508.37	38.53 %	40.00 pg/mL	38.85 pg/mL	97.11 %
Std005	305	2,906.57	756.22	24.74 %	80.00 pg/mL	88.62 pg/mL	110.77 %
Std006	312	5,482.15	1,713.70	34.28 %	156.00 pg/mL	164.39 pg/mL	105.38 %
Std007	300	8,484.76	2,625.37	28.31 %	312.50 pg/mL	256.47 pg/mL	82.07 %
Std008	336	19,075.39	5,576.21	25.81 %	625.00 pg/mL	623.92 pg/mL	99.83 %
Std009	326	34,610.72	9,561.33	25.07 %	1,250.00 pg/mL	1,292.23 pg/mL	103.38 %
Std010	313	58,035.00	19,227.61	27.97 %	2,500.00 pg/mL	2,608.43 pg/mL	104.34 %

B8-Human IFN- $\alpha$

R<sup>2</sup>=99.77% A: 4.496 B: 2.418 C: 8.032 D: 14.711 E: 0.000

Fitting type: 5 Parameter Logistic

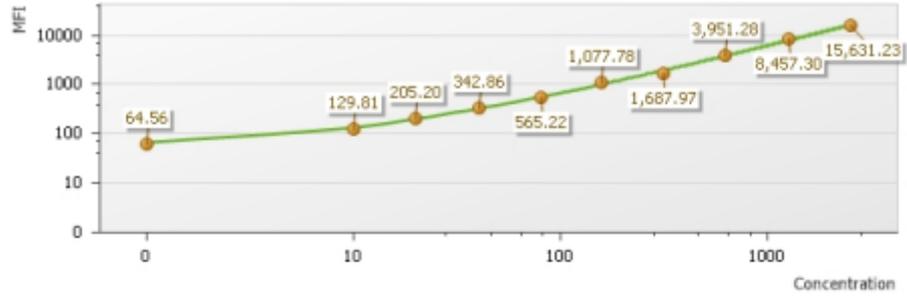


Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	479	92.12	118.95	129.59 %	0.00 pg/mL	0.99 pg/mL	0.00 %
Std002	554	133.20	100.84	76.62 %	10.00 pg/mL	7.40 pg/mL	73.99 %
Std003	491	233.44	155.07	69.65 %	20.00 pg/mL	22.14 pg/mL	110.71 %
Std004	535	332.29	179.22	53.42 %	40.00 pg/mL	36.92 pg/mL	92.30 %
Std005	530	694.95	237.54	33.45 %	80.00 pg/mL	92.00 pg/mL	115.00 %
Std006	518	1,169.42	340.79	28.79 %	156.00 pg/mL	165.50 pg/mL	106.09 %
Std007	539	1,819.09	466.40	33.83 %	312.50 pg/mL	268.94 pg/mL	86.06 %
Std008	524	3,954.32	1,006.13	29.00 %	625.00 pg/mL	633.50 pg/mL	101.36 %
Std009	501	7,108.26	1,781.77	29.66 %	1,250.00 pg/mL	1,241.88 pg/mL	99.35 %
Std010	547	12,904.10	3,432.47	30.00 %	2,500.00 pg/mL	2,575.18 pg/mL	103.01 %

E7-Human IFN-γ

R<sup>2</sup>=99.88% A: 4.176 B: 1.853 C: 17.022 D: 32.973 E: 0.000

Fitting type: 5 Parameter Logistic

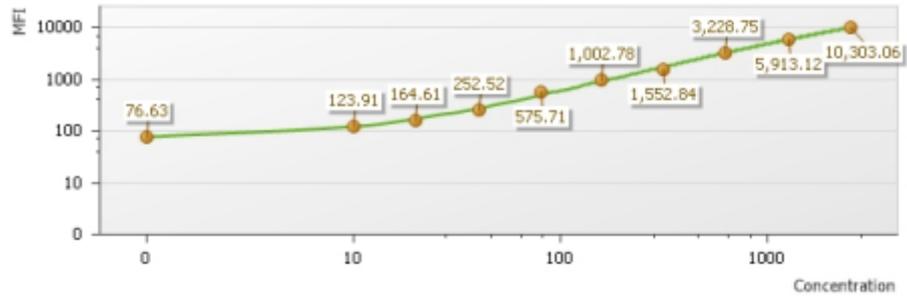


Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	581	64.56	120.63	175.21 %	0.00 pg/mL	0.00 pg/mL	0.00 %
Std002	582	129.81	95.88	77.55 %	10.00 pg/mL	9.00 pg/mL	89.95 %
Std003	570	205.20	136.76	64.36 %	20.00 pg/mL	20.26 pg/mL	101.28 %
Std004	523	342.86	199.32	53.68 %	40.00 pg/mL	42.35 pg/mL	105.86 %
Std005	547	565.22	228.06	37.07 %	80.00 pg/mL	79.48 pg/mL	99.35 %
Std006	507	1,077.78	428.00	35.95 %	156.00 pg/mL	166.33 pg/mL	106.62 %
Std007	598	1,687.97	706.86	36.31 %	312.50 pg/mL	269.15 pg/mL	86.13 %
Std008	549	3,951.28	1,333.04	30.32 %	625.00 pg/mL	640.20 pg/mL	102.43 %
Std009	555	8,457.30	2,835.63	29.12 %	1,250.00 pg/mL	1,345.59 pg/mL	107.65 %
Std010	527	15,631.23	5,600.95	31.21 %	2,500.00 pg/mL	2,418.53 pg/mL	96.74 %

B6-Human IL-9

R<sup>2</sup>=99.78% A: 4.343 B: 2.651 C: 7.175 D: 13.094 E: 0.000

Fitting type: 5 Parameter Logistic

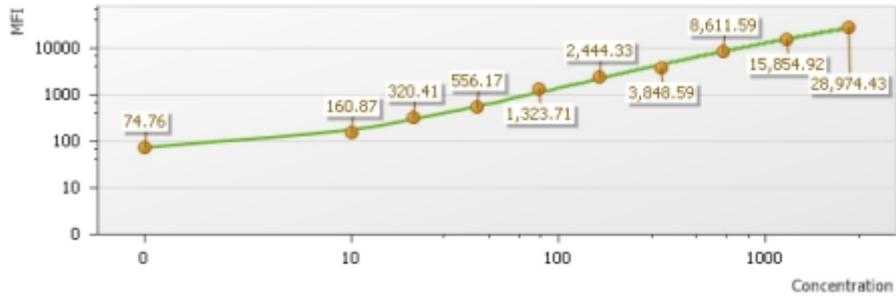


Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	348	76.63	117.43	150.53 %	0.00 pg/mL	0.00 pg/mL	0.00 %
Std002	392	123.91	87.99	67.62 %	10.00 pg/mL	10.53 pg/mL	105.31 %
Std003	360	164.61	135.69	80.25 %	20.00 pg/mL	18.21 pg/mL	91.03 %
Std004	340	252.52	150.97	60.15 %	40.00 pg/mL	34.53 pg/mL	86.32 %
Std005	328	575.71	208.07	32.41 %	80.00 pg/mL	93.51 pg/mL	116.89 %
Std006	262	1,002.78	261.32	27.57 %	156.00 pg/mL	171.53 pg/mL	109.96 %
Std007	283	1,552.84	302.74	19.89 %	312.50 pg/mL	274.53 pg/mL	87.85 %
Std008	286	3,228.75	664.26	23.67 %	625.00 pg/mL	614.22 pg/mL	98.27 %
Std009	369	5,913.12	1,104.17	24.40 %	1,250.00 pg/mL	1,252.56 pg/mL	100.20 %
Std010	334	10,303.06	1,389.32	15.28 %	2,500.00 pg/mL	2,574.51 pg/mL	102.98 %

B7-Human IL-10

R<sup>2</sup>=99.81% A: 4.297 B: 2.198 C: 7.168 D: 15.120 E: 0.000

Fitting type: 5 Parameter Logistic



Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	361	74.76	122.96	156.18 %	0.00 pg/mL	0.46 pg/mL	0.00 %
Std002	297	160.87	110.42	66.19 %	10.00 pg/mL	8.44 pg/mL	84.45 %
Std003	365	320.41	181.39	52.92 %	20.00 pg/mL	20.99 pg/mL	104.97 %
Std004	357	556.17	249.67	47.35 %	40.00 pg/mL	38.35 pg/mL	95.86 %
Std005	326	1,323.71	352.40	25.67 %	80.00 pg/mL	91.58 pg/mL	114.48 %
Std006	350	2,444.33	744.18	30.73 %	156.00 pg/mL	167.47 pg/mL	107.35 %
Std007	317	3,848.59	1,012.37	25.73 %	312.50 pg/mL	263.84 pg/mL	84.43 %
Std008	318	8,611.59	1,628.59	20.34 %	625.00 pg/mL	615.67 pg/mL	98.51 %
Std009	361	15,854.92	3,866.21	30.88 %	1,250.00 pg/mL	1,238.55 pg/mL	99.08 %
Std010	323	28,974.43	7,715.32	23.43 %	2,500.00 pg/mL	2,656.90 pg/mL	106.28 %

A9-Human IL-8

R<sup>2</sup>=99.85% A: 3.863 B: 2.096 C: 7.469 D: 15.217 E: 0.000

Fitting type: 5 Parameter Logistic

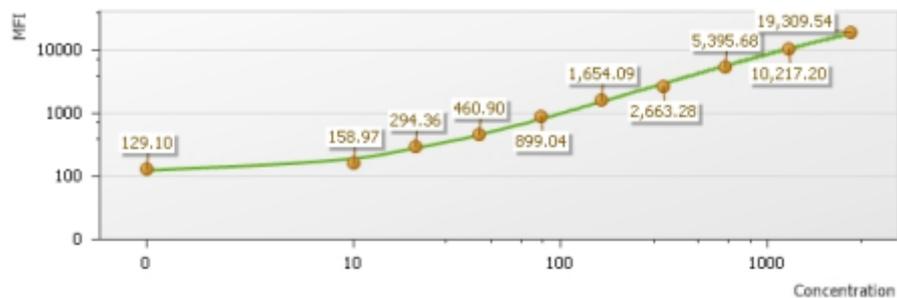


Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	657	47.35	121.46	250.40 %	0.00 pg/mL	0.00 pg/mL	0.00 %
Std002	716	119.37	101.78	85.17 %	10.00 pg/mL	9.43 pg/mL	94.29 %
Std003	696	210.22	161.65	77.83 %	20.00 pg/mL	19.63 pg/mL	98.15 %
Std004	597	372.38	199.23	52.14 %	40.00 pg/mL	36.99 pg/mL	92.49 %
Std005	616	925.55	238.04	27.24 %	80.00 pg/mL	93.68 pg/mL	117.10 %
Std006	525	1,638.83	374.31	23.19 %	156.00 pg/mL	166.11 pg/mL	106.48 %
Std007	581	2,680.45	706.87	26.71 %	312.50 pg/mL	274.38 pg/mL	87.80 %
Std008	527	5,647.10	1,027.44	18.96 %	625.00 pg/mL	607.84 pg/mL	97.25 %
Std009	589	10,344.55	1,644.44	17.93 %	1,250.00 pg/mL	1,219.40 pg/mL	97.55 %
Std010	673	19,223.76	3,915.47	20.43 %	2,500.00 pg/mL	2,663.50 pg/mL	106.54 %

A5-Human IL-4

R<sup>2</sup>=99.72% A: 4.796 B: 2.630 C: 7.304 D: 14.000 E: 0.000

Fitting type: 5 Parameter Logistic

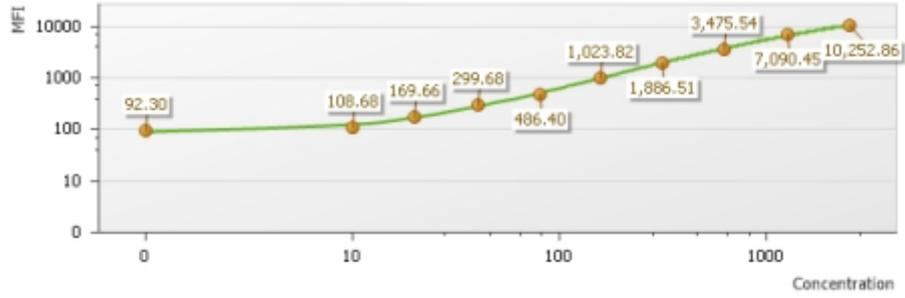


Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	658	129.10	126.21	113.39 %	0.00 pg/mL	2.05 pg/mL	0.00 %
Std002	632	158.97	92.94	55.15 %	10.00 pg/mL	5.96 pg/mL	59.56 %
Std003	585	294.36	158.70	50.94 %	20.00 pg/mL	21.69 pg/mL	108.44 %
Std004	651	460.90	198.09	41.34 %	40.00 pg/mL	40.42 pg/mL	101.05 %
Std005	670	899.04	241.78	26.45 %	80.00 pg/mL	88.38 pg/mL	110.48 %
Std006	597	1,654.09	391.28	23.28 %	156.00 pg/mL	169.72 pg/mL	108.80 %
Std007	643	2,663.28	695.19	25.28 %	312.50 pg/mL	279.37 pg/mL	89.40 %
Std008	600	5,395.68	1,220.03	23.57 %	625.00 pg/mL	592.31 pg/mL	94.77 %
Std009	612	10,217.20	2,171.67	21.29 %	1,250.00 pg/mL	1,218.10 pg/mL	97.45 %
Std010	617	19,309.54	4,848.58	27.19 %	2,500.00 pg/mL	2,685.92 pg/mL	107.44 %

CB-Human G-CSF

R<sup>2</sup>=99.86% A: 4.489 B: 3.237 C: 6.178 D: 11.479 E: 0.000

Fitting type: 5 Parameter Logistic

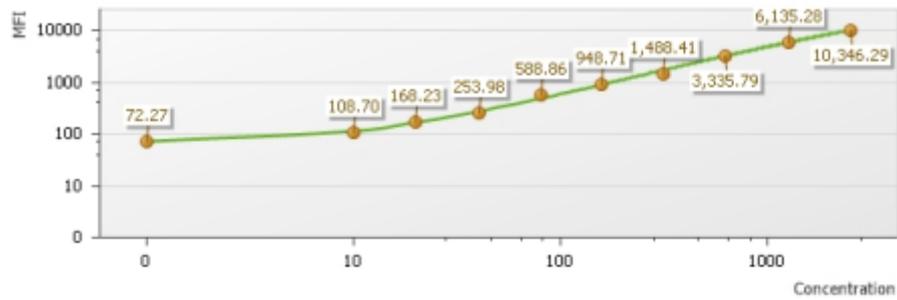


Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	477	92.30	125.86	135.35 %	0.00 pg/mL	2.36 pg/mL	0.00 %
Std002	473	108.68	92.78	88.02 %	10.00 pg/mL	6.97 pg/mL	69.72 %
Std003	481	169.66	151.45	90.82 %	20.00 pg/mL	20.07 pg/mL	100.35 %
Std004	484	299.68	174.10	60.03 %	40.00 pg/mL	44.37 pg/mL	110.94 %
Std005	464	486.40	210.82	43.08 %	80.00 pg/mL	76.33 pg/mL	95.41 %
Std006	511	1,023.82	358.53	38.45 %	156.00 pg/mL	162.70 pg/mL	104.29 %
Std007	460	1,886.51	872.12	41.90 %	312.50 pg/mL	301.24 pg/mL	96.40 %
Std008	455	3,475.54	1,202.60	31.75 %	625.00 pg/mL	580.43 pg/mL	92.87 %
Std009	412	7,090.45	2,320.47	30.37 %	1,250.00 pg/mL	1,400.56 pg/mL	112.04 %
Std010	448	10,252.86	4,891.57	36.44 %	2,500.00 pg/mL	2,406.26 pg/mL	96.25 %

E5-Human IL-12p70

R<sup>2</sup>=99.74% A: 4.265 B: 2.588 C: 7.279 D: 13.365 E: 0.000

Fitting type: 5 Parameter Logistic

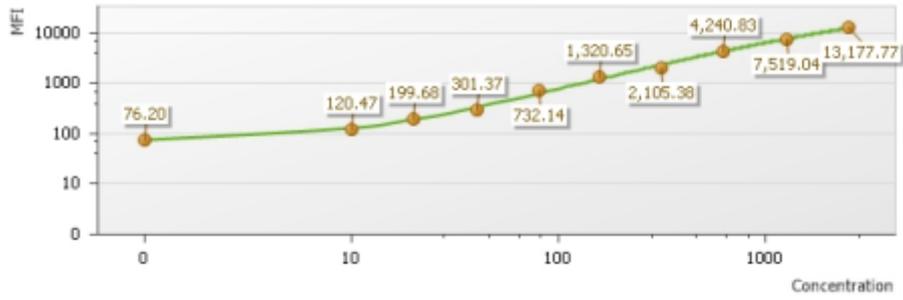


Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	523	72.27	134.22	166.65 %	0.00 pg/mL	0.84 pg/mL	0.00 %
Std002	522	108.70	85.89	76.98 %	10.00 pg/mL	8.64 pg/mL	86.42 %
Std003	528	168.23	129.00	75.32 %	20.00 pg/mL	19.91 pg/mL	99.55 %
Std004	507	253.98	191.45	66.42 %	40.00 pg/mL	35.87 pg/mL	89.67 %
Std005	511	588.86	217.42	37.88 %	80.00 pg/mL	97.08 pg/mL	121.35 %
Std006	562	948.71	271.29	25.72 %	156.00 pg/mL	162.75 pg/mL	104.33 %
Std007	480	1,488.41	453.75	27.33 %	312.50 pg/mL	263.15 pg/mL	84.21 %
Std008	477	3,335.79	763.18	22.20 %	625.00 pg/mL	634.41 pg/mL	101.51 %
Std009	478	6,135.28	1,455.17	22.69 %	1,250.00 pg/mL	1,292.20 pg/mL	103.38 %
Std010	477	10,346.29	3,075.25	25.44 %	2,500.00 pg/mL	2,517.84 pg/mL	100.71 %

C9-Human GM-CSF

R<sup>2</sup>=99.79% A: 4.318 B: 2.672 C: 6.514 D: 12.578 E: 0.000

Fitting type: 5 Parameter Logistic

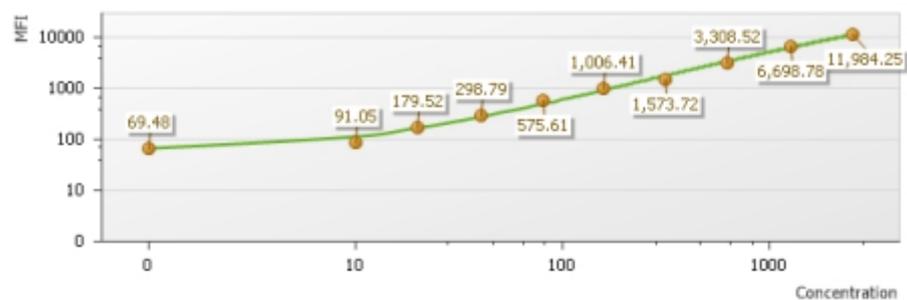


Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	503	76.20	125.28	159.05 %	0.00 pg/mL	0.85 pg/mL	0.00 %
Std002	472	120.47	91.59	68.06 %	10.00 pg/mL	8.82 pg/mL	88.16 %
Std003	463	199.68	144.58	76.98 %	20.00 pg/mL	20.62 pg/mL	103.12 %
Std004	481	301.37	198.17	61.65 %	40.00 pg/mL	34.96 pg/mL	87.41 %
Std005	490	732.14	225.24	33.74 %	80.00 pg/mL	92.56 pg/mL	115.70 %
Std006	479	1,320.65	265.50	20.04 %	156.00 pg/mL	170.25 pg/mL	109.13 %
Std007	438	2,105.38	364.88	20.33 %	312.50 pg/mL	277.33 pg/mL	88.74 %
Std008	524	4,240.83	939.32	23.26 %	625.00 pg/mL	602.08 pg/mL	96.33 %
Std009	448	7,519.04	1,081.33	17.51 %	1,250.00 pg/mL	1,216.96 pg/mL	97.36 %
Std010	497	13,177.77	2,267.86	18.13 %	2,500.00 pg/mL	2,682.28 pg/mL	107.29 %

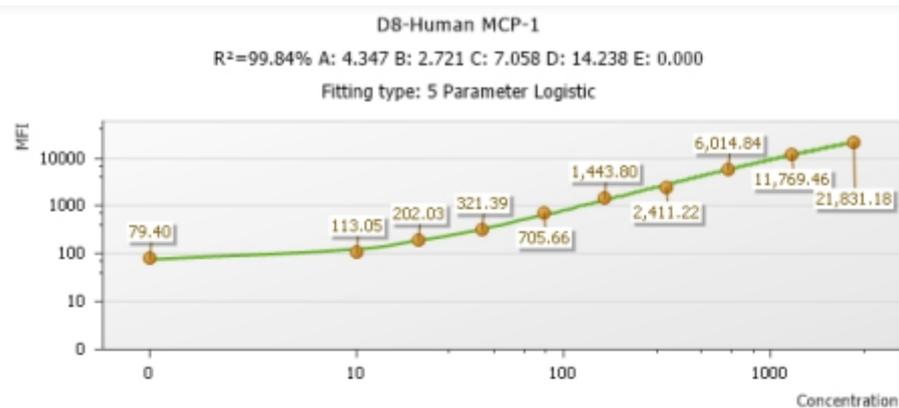
A7-Human IL-6

R<sup>2</sup>=99.62% A: 4.182 B: 2.425 C: 7.785 D: 14.467 E: 0.000

Fitting type: 5 Parameter Logistic



Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	554	69.48	124.45	189.60 %	0.00 pg/mL	1.53 pg/mL	0.00 %
Std002	536	91.05	92.86	101.37 %	10.00 pg/mL	5.74 pg/mL	57.43 %
Std003	524	179.52	148.60	85.96 %	20.00 pg/mL	21.59 pg/mL	107.93 %
Std004	545	298.79	167.77	62.02 %	40.00 pg/mL	42.69 pg/mL	106.72 %
Std005	530	575.61	222.27	38.85 %	80.00 pg/mL	91.07 pg/mL	113.84 %
Std006	539	1,006.41	313.35	29.09 %	156.00 pg/mL	166.08 pg/mL	106.46 %
Std007	526	1,573.72	603.56	35.27 %	312.50 pg/mL	266.02 pg/mL	85.13 %
Std008	487	3,308.52	999.23	28.00 %	625.00 pg/mL	587.00 pg/mL	93.92 %
Std009	522	6,698.78	1,976.47	30.53 %	1,250.00 pg/mL	1,293.29 pg/mL	103.46 %
Std010	493	11,984.25	4,037.99	27.67 %	2,500.00 pg/mL	2,612.60 pg/mL	104.50 %



Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	631	79.40	127.72	165.32 %	0.00 pg/mL	1.26 pg/mL	0.00 %
Std002	588	113.05	86.28	70.03 %	10.00 pg/mL	7.70 pg/mL	77.04 %
Std003	571	202.03	127.65	75.19 %	20.00 pg/mL	21.46 pg/mL	107.29 %
Std004	598	321.39	165.52	48.57 %	40.00 pg/mL	38.16 pg/mL	95.39 %
Std005	562	705.66	182.18	25.70 %	80.00 pg/mL	86.14 pg/mL	107.67 %
Std006	548	1,443.80	329.17	23.53 %	156.00 pg/mL	168.65 pg/mL	108.11 %
Std007	567	2,411.22	601.18	23.89 %	312.50 pg/mL	270.19 pg/mL	86.46 %
Std008	600	6,014.84	1,369.77	25.67 %	625.00 pg/mL	639.72 pg/mL	102.36 %
Std009	554	11,769.46	2,294.37	20.11 %	1,250.00 pg/mL	1,265.12 pg/mL	101.21 %
Std010	582	21,831.18	4,710.10	21.10 %	2,500.00 pg/mL	2,529.85 pg/mL	101.19 %

**Anexo 2. Tabla con Desviación estándar (DE) y Prueba “t” student (PT) para cada citoquina.**

	<b>IL- 1<math>\beta</math></b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	379,018738	1618,0616	1881,6093	1323,1796	1655,65528
Casos AR	554,863012	1274,9666	1329,5494	950,66976	1212,73106
DE	124,340679	242,60478	390,36531	263,40422	313,194724

<b>IL 1<math>\beta</math></b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	0,00	758,04	1085,87	23,85
CD3/CD28	160,41	3075,71	2310,06	239,87
100 ug/mL SRM1649b	584,42	3178,80	2280,10	876,95
10 ug/mL SRM1649b	299,78	2346,58	1568,33	333,01
1 ug/mL SRM1649b	70,94	14169,85	2155,43	270,04
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,86553104			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,59903339			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,83081843			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,57096969			
PT 10 ug/mL- 1 ug/mL (AR)	0,83775763			

	<b>RANTES</b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	7479,13977	9752,1844	6514,9289	8866,2652	9110,33057
Casos AR	6860,70115	8038,0522	3072,7791	8301,1152	8649,71669
DE	437,302141	1212,0746	2433,9675	399,62141	325,7032

<b>RANTES</b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	556,73	14401,55	12336,69	1384,72
CD3/CD28	6910,10	12594,27	9833,07	6243,04
100 ug/mL SRM1649b	5508,75	7521,11	5767,56	6666,65
10 ug/mL SRM1649b	7374,14	10358,39	8535,56	8066,67
1 ug/mL SRM1649b	4050,81	14169,85	10154,42	7145,01
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,66079902			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,8570181			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,42883605			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,05440223			
PT 10 ug/mL- 1 ug/mL (AR)	0,84021429			

	<b>IL-13</b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	2,17258898	84,644436	103,57594	81,351037	50,2031967
Casos AR	6,76344587	82,689083	67,286254	56,189123	75,1945577
DE	3,24622604	1,3826434	25,660684	17,79216	17,6715608

<b>IL-13</b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	0,00	4,35	7,57	5,96
CD3/CD28	74,16	95,13	93,92	71,45
100 ug/mL SRM1649b	117,88	89,27	71,38	63,19
10 ug/mL SRM1649b	97,76	64,94	52,56	59,82
1 ug/mL SRM1649b	28,90	71,50	81,00	69,39
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,91039781			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,02130864			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,3266173			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,17973757			
PT 10 ug/mL- 1 ug/mL (AR)	0,10895615			

	<b>IL-2</b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	11,7271108	14158,071	15000,342	14024,89	7592,13276
Casos AR	182,439157	8208,4522	7058,0128	5240,5669	7877,16746
DE	120,711646	4207,0158	5616,075	6211,4546	201,549972

<b>IL-2</b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	9,31	14,14	340,25	24,63
CD3/CD28	15942,53	12373,61	12895,41	3521,49
100 ug/mL SRM1649b	18712,43	11288,26	11296,26	2819,76
10 ug/mL SRM1649b	19831,90	8217,88	7736,99	2744,15
1 ug/mL SRM1649b	3613,63	11570,63	12509,84	3244,50
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,35732078			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,22912945			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,87231855			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,74721802			
PT 10 ug/mL- 1 ug/mL (AR)	0,66606344			

	<b>IL-5</b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	1,0971134	45,10471	49,874232	45,247877	26,8888988
Casos AR	2,01152792	51,172105	45,599956	38,14004	51,3415535
DE	0,6465887	4,2902962	3,0223697	5,0259993	17,290638

<b>IL-5</b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	0,88	1,31	3,16	0,86
CD3/CD28	63,17	27,04	39,19	63,16
100 ug/mL SRM1649b	71,83	27,92	31,57	59,63
10 ug/mL SRM1649b	68,26	22,24	26,89	49,39
1 ug/mL SRM1649b	29,69	24,08	38,35	64,34
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,80585087			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,05506192			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,79115852			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,7185408			
PT 10 ug/mL- 1 ug/mL (AR)	0,52278229			

	<b>IFN- <math>\alpha</math></b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	1,43193409	2,02246	3,3389325	5,1498568	2,72128926
Casos AR	1,89949336	0	2,3278953	1,1397641	0
DE	0,33061433	1,4300952	0,7149112	2,8355638	1,92424209

<b>IFN- <math>\alpha</math></b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	0,00	2,86	0,00	3,80
CD3/CD28	4,04	0,00	0,00	0,00
100 ug/mL SRM1649b	4,52	2,16	0,00	4,66
10 ug/mL SRM1649b	6,75	3,55	2,28	0,00
1 ug/mL SRM1649b	5,44	0,00	0,00	0,00
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,42264973			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,42264973			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,42264973			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,69165932			
PT 10 ug/mL- 1 ug/mL (AR)	0,42264973			

	<b>IFN- <math>\gamma</math></b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	4,3176002	1686,6749	1916,5907	1670,719	1176,38288
Casos AR	20,535836	983,87224	862,8973	686,88447	1050,35134
DE	11,4680245	496,9565	745,07375	695,67608	89,1177575

<b>IFN- <math>\gamma</math></b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	1,31	7,32	34,92	6,15
CD3/CD28	1589,03	1784,32	1564,34	403,41
100 ug/mL SRM1649b	2193,85	1639,33	1401,21	324,58
10 ug/mL SRM1649b	1973,50	1367,94	1139,94	233,83
1 ug/mL SRM1649b	590,43	1762,34	1746,29	354,41
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,35489629			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,23896587			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,89257085			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,82581118			
PT 10 ug/mL- 1 ug/mL (AR)	0,7043403			

	<b>IL-9</b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	4,16131107	539,79437	492,32141	515,77246	540,540016
Casos AR	10,6975511	523,78875	475,41538	359,17509	504,121281
DE	4,62181968	11,317685	11,954368	110,73106	25,7519339

<b>IL-9</b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	0,00	8,32	15,64	5,75
CD3/CD28	300,98	778,61	303,20	744,38
100 ug/mL SRM1649b	290,38	694,26	237,10	713,73
10 ug/mL SRM1649b	297,97	733,57	290,14	428,21
1 ug/mL SRM1649b	236,00	845,08	342,45	665,80
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,96520816			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,14559364			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,89524786			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,6855343			
PT 10 ug/mL- 1 ug/mL (AR)	0,49633744			

	<b>IL-10</b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	593,735633	4550,3695	3416,2058	3629,893	4284,78285
Casos AR	500,448463	1649,1769	1607,4427	1305,6798	1723,05324
DE	65,9639907	2051,4529	1278,9887	1643,4669	1811,41638

<b>IL-10</b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	18,31	1169,17	938,19	62,71
CD3/CD28	2634,28	6466,45	2534,97	763,38
100 ug/mL SRM1649b	2463,77	4368,64	1922,98	1291,91
10 ug/mL SRM1649b	2790,53	4469,26	1877,88	733,48
1 ug/mL SRM1649b	1037,24	7532,32	2563,32	882,79
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,30306795			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,36495415			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,96863192			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,68958216			
PT 10 ug/mL- 1 ug/mL (AR)	0,72120075			

	<b>IL-8</b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	9713,42873	14262,262	18813,401	21245,101	4590,09299
Casos AR	31908,9759	30272,469	22891,983	10247,896	25725,575
DE	15694,6219	11320,926	2883,993	7776,1982	14945,0427

<b>IL-8</b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	2655,47	16771,39	14395,37	49422,58
CD3/CD28	19891,05	8633,48	42899,61	17645,32
100 ug/mL SRM1649b	16501,37	21125,43	42342,61	3441,35
10 ug/mL SRM1649b	34784,18	7706,02	11783,59	8712,21
1ug/mL SRM1649b	3180,56	5999,63	44164,01	7287,14
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,36643913			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,94648108			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,78044526			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,58341829			
PT 10 ug/mL- 1ug/mL (AR)	0,49088426			

	<b>IL-4</b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	3,83660602	69,498772	79,809024	68,677624	25,3942485
Casos AR	7,6797908	54,997789	49,836502	30,319464	53,6108079
DE	2,71754202	10,253743	21,193773	27,123315	19,9521205

<b>IL-4</b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	3,18	4,49	3,39	11,96
CD3/CD28	97,42	41,58	57,66	52,33
100 ug/mL SRM1649b	111,34	48,28	64,31	35,36
10 ug/mL SRM1649b	105,10	32,25	39,23	21,41
1ug/mL SRM1649b	27,48	23,31	66,54	40,68
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,65661886			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,01118422			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,75934282			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,36968891			
PT 10 ug/mL- 1ug/mL (AR)	0,27626449			

	<b>G-CSF</b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	686,201139	156,9437	981,81703	838,67305	2064,62914
Casos AR	710,284427	460,07189	934,81823	378,8048	446,338645
DE	17,0294562	214,344	33,233171	325,17596	1144,30418

<b>G-CSF</b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	103,12	1269,28	1301,17	119,40
CD3/CD28	191,24	122,65	752,95	167,20
100 ug/mL SRM1649b	327,22	1636,41	1100,42	769,22
10 ug/mL SRM1649b	168,68	1508,66	552,44	205,17
1 ug/mL SRM1649b	97,77	4031,49	759,86	132,82
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,41202926			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,74088263			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,29368657			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,14640809			
PT 10 ug/mL- 1 ug/mL (AR)	0,86792254			

	<b>IL-12P70</b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	1,76072258	77,332095	23,528544	51,508047	38,0303626
Casos AR	6,70601286	7,2196518	7,7787255	7,381796	7,44130697
DE	3,4968483	49,576984	11,136803	31,201971	21,6297287

<b>IL-12P70</b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	0,00	3,52	7,65	5,76
CD3/CD28	137,14	17,53	3,67	10,77
100 ug/mL SRM1649b	43,06	4,00	10,31	5,25
10 ug/mL SRM1649b	93,69	9,33	9,65	5,11
1 ug/mL SRM1649b	74,25	1,81	9,49	5,39
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,36245238			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,9015165			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,90962352			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,9177634			
PT 10 ug/mL- 1 ug/mL (AR)	0,98624594			

	<b>GM-CSF</b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	3,79471036	489,06239	911,22897	590,32839	314,190288
Casos AR	31,0503209	327,75086	351,19	291,21816	375,439729
DE	19,2726271	114,06448	396,00736	211,50287	43,3098948

<b>GM-CSF</b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	0,00	7,59	61,63	0,47
CD3/CD28	435,75	542,38	578,35	77,15
100 ug/mL SRM1649b	1005,63	816,82	563,19	139,19
10 ug/mL SRM1649b	736,34	444,32	550,20	32,24
1 ug/mL SRM1649b	166,80	461,58	697,90	52,98
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,59328412			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,36086641			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,94957113			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,87429804			
PT 10 ug/mL- 1 ug/mL (AR)	0,85747402			

	<b>IL-6</b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	14461,7638	13539,57	21357,763	8756,4963	13193,603
Casos AR	12844,0894	15744,433	24571,009	10520,488	15790,8057
DE	1143,86855	1559,0731	2272,1081	1247,3304	1836,49962

<b>IL-6</b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	8,58	28914,95	25144,33	543,85
CD3/CD28	1410,73	25668,41	30075,78	1413,09
100 ug/mL SRM1649b	15681,91	27033,62	35605,41	13536,61
10 ug/mL SRM1649b	2080,98	15432,02	16163,62	4877,35
1 ug/mL SRM1649b	504,71	25882,50	29767,42	1814,19
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,91724448			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,89204383			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,67380471			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,37452646			
PT 10 ug/mL- 1 ug/mL (AR)	0,75998286			

	<b>MCP-1</b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	507,086647	4064,9758	6254,7632	4628,1548	1746,41502
Casos AR	7103,74046	4047,4646	5647,8363	6760,9182	4322,95453
DE	4664,53865	12,382284	429,1621	1508,0915	1821,88856

<b>MCP-1</b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	313,01	701,16	3049,02	11158,46
CD3/CD28	6780,31	1349,64	3228,86	4866,07
100 ug/mL SRM1649b	10798,45	1711,07	4573,41	6722,26
10 ug/mL SRM1649b	8107,23	1149,08	2547,36	10974,48
1 ug/mL SRM1649b	1835,83	1657,00	3338,87	5307,04
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,995634			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,53694142			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,35780253			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,82189193			
PT 10 ug/mL- 1 ug/mL (AR)	0,62988325			

	<b>TNF</b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	8,41360067	4992,0538	7816,058	5645,8097	2955,71672
Casos AR	25,8541785	1574,3137	2700,7941	1173,2491	1582,29558
DE	12,3323508	2416,7072	3617,0378	3162,5779	971,155402

<b>TNF</b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	2,41	14,42	45,58	6,13
CD3/CD28	6334,97	3649,13	2444,18	704,45
100 ug/mL SRM1649b	8828,82	6803,30	3565,70	1835,89
10 ug/mL SRM1649b	7853,55	3438,07	2000,37	346,13
1ug/mL SRM1649b	2319,96	3591,47	2708,86	455,73
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,16618521			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,21709332			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,45539264			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,32998284			
PT 10 ug/mL- 1 ug/mL (AR)	0,79733932			

	<b>IL-17A</b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	48,7271005	778,32416	725,11627	801,55411	495,528075
Casos AR	59,1976711	543,51675	392,02567	414,18944	610,038741
DE	7,40381147	166,03391	235,53062	273,90819	80,9712683

<b>IL-17A</b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	5,03	92,43	73,32	45,07
CD3/CD28	589,61	967,04	892,45	194,58
100 ug/mL SRM1649b	732,85	717,38	586,18	197,88
10 ug/mL SRM1649b	854,90	748,21	675,48	152,90
1ug/mL SRM1649b	285,35	705,70	1011,23	208,85
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,61391399			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,29983514			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,74089993			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,95191184			
PT 10 ug/mL- 1 ug/mL (AR)	0,7221405			

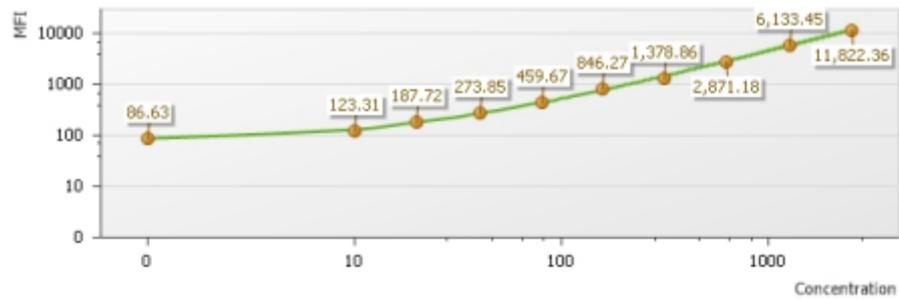
	<b>IL-7</b>				
	Sin estímulo	CD3/CD28	100 ug/mL SRM1649b	10 ug/mL SRM1649b	1 ug/mL SRM1649b
Controles	21,4923547	1,9554555	26,212633	7,5044673	18,2545934
Casos AR	20,8988154	19,24476	29,34547	12,178448	33,2532781
DE	0,41969566	12,225384	2,2152505	3,3050032	10,6056717

<b>IL-7</b>	Controles		Casos con AR	
	Y.A	L.G	L.O	S.S
SE	18,68	24,30	41,80	0,00
CD3/CD28	3,91	0,00	0,00	38,49
100 ug/mL SRM1649b	16,96	35,47	32,50	26,19
10 ug/mL SRM1649b	9,29	5,72	24,36	0,00
1 ug/mL SRM1649b	36,51	0,00	39,75	26,76
PT CD3/CD28 AR-CTRL	0,4657504			
PT CD3/CD28- SE (AR)	0,95886628			
PT CD3/CD28- 100 ug/mL (AR)	0,6561088			
PT 100 ug/mL- 10 ug/mL (AR)	0,30566348			
PT 10 ug/mL- 1 ug/mL (AR)	0,2662992			

C4-Human TNF

R<sup>2</sup>=99.92% A: 4.453 B: 2.337 C: 10.975 D: 20.261 E: 0.000

Fitting type: 5 Parameter Logistic

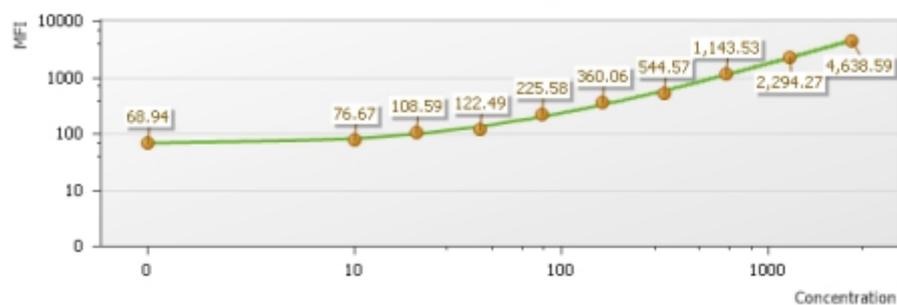


Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	544	86.63	114.84	143.20 %	0.00 pg/mL	0.57 pg/mL	0.00 %
Std002	533	123.31	94.38	78.08 %	10.00 pg/mL	8.05 pg/mL	80.47 %
Std003	507	187.72	137.73	68.66 %	20.00 pg/mL	21.17 pg/mL	105.85 %
Std004	518	273.85	192.46	67.48 %	40.00 pg/mL	39.76 pg/mL	99.40 %
Std005	507	459.67	201.15	40.78 %	80.00 pg/mL	81.24 pg/mL	101.54 %
Std006	543	846.27	274.61	28.27 %	156.00 pg/mL	168.30 pg/mL	107.88 %
Std007	557	1,378.86	546.04	39.52 %	312.50 pg/mL	286.95 pg/mL	91.83 %
Std008	546	2,871.18	898.03	31.79 %	625.00 pg/mL	611.44 pg/mL	97.83 %
Std009	503	6,133.45	1,754.13	28.35 %	1,250.00 pg/mL	1,300.28 pg/mL	104.02 %
Std010	529	11,822.36	4,540.45	37.12 %	2,500.00 pg/mL	2,481.54 pg/mL	99.26 %

B5-Human IL-17A

R<sup>2</sup>=99.76% A: 4.213 B: 2.853 C: 9.927 D: 16.766 E: 0.000

Fitting type: 5 Parameter Logistic

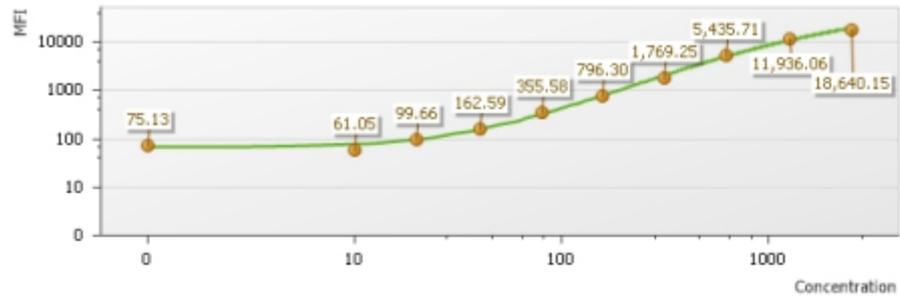


Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	634	68.94	125.17	182.97 %	0.00 pg/mL	1.82 pg/mL	0.00 %
Std002	598	76.67	91.38	109.61 %	10.00 pg/mL	6.29 pg/mL	62.89 %
Std003	621	108.59	144.59	135.31 %	20.00 pg/mL	23.31 pg/mL	116.57 %
Std004	637	122.49	153.79	121.87 %	40.00 pg/mL	31.03 pg/mL	77.58 %
Std005	593	225.58	143.11	63.54 %	80.00 pg/mL	91.14 pg/mL	113.92 %
Std006	627	360.06	160.86	43.09 %	156.00 pg/mL	171.34 pg/mL	109.83 %
Std007	597	544.57	185.85	36.44 %	312.50 pg/mL	280.57 pg/mL	89.78 %
Std008	615	1,143.53	265.58	25.09 %	625.00 pg/mL	624.70 pg/mL	99.95 %
Std009	616	2,294.27	509.62	24.32 %	1,250.00 pg/mL	1,258.90 pg/mL	100.71 %
Std010	563	4,638.59	1,173.25	24.63 %	2,500.00 pg/mL	2,511.41 pg/mL	100.46 %

A8-Human IL-7

R<sup>2</sup>=99.72% A: 4.195 B: 4.288 C: 5.954 D: 11.651 E: 0.000

Fitting type: 5 Parameter Logistic



Name	Event #	MFI	SD	CV% (MFI)	Nominal CC	Fitted CC	Recovery %
Std001	510	75.13	123.13	169.81 %	0.00 pg/mL	8.97 pg/mL	0.00 %
Std002	456	61.05	89.47	139.21 %	10.00 pg/mL	0.00 pg/mL	0.00 %
Std003	500	99.66	141.05	157.06 %	20.00 pg/mL	20.34 pg/mL	101.72 %
Std004	522	162.59	159.78	105.11 %	40.00 pg/mL	41.20 pg/mL	103.00 %
Std005	559	355.58	202.77	57.33 %	80.00 pg/mL	85.72 pg/mL	107.15 %
Std006	504	796.30	358.21	46.10 %	156.00 pg/mL	157.31 pg/mL	100.84 %
Std007	543	1,769.25	1,091.51	52.45 %	312.50 pg/mL	277.59 pg/mL	88.83 %
Std008	533	5,435.71	2,507.70	39.54 %	625.00 pg/mL	655.16 pg/mL	104.83 %
Std009	484	11,936.06	4,812.28	33.87 %	1,250.00 pg/mL	1,372.48 pg/mL	109.80 %
Std010	474	18,640.15	10,588.17	42.96 %	2,500.00 pg/mL	2,324.38 pg/mL	92.98 %