



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**Identificación de los epítopes reconocidos por los anticuerpos
anti-péptidos citrulinados presentes en los pacientes con
artritis temprana**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

Q.F.B. ELIZABETH OLIVARES MARTÍNEZ

DIRECTOR DE LA TESIS: DR. JAVIER CABIEDES CONTRERAS

México, D.F. 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos:

Gracias al Posgrado de Ciencias Biológicas, UNAM por permitirme crecer como profesional y como persona.

Gracias a los miembros de mi comité tutorial:

Al Dr. Javier Cabiedes Contreras, por todas sus enseñanzas, apoyo y amistad que siempre me ha dado.

A la Dra. Gohar Gevorgyan Markosian, por sus consejos y el apoyo brindado.

Al Dr. Rubén Burgos Vargas, por su apoyo, sus críticas y comentarios acertados.

Agradecimientos:

Al Departamento de Inmunología y Reumatología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) por el apoyo y los recursos recibidos.

A la Dra. Virginia Pascual Ramos del Depto. de Inmunología y Reumatología del INCMNSZ, por su apoyo en la obtención de muestras.

Al M en C Diego F. Hernández Ramírez del Depto. de Inmunología y Reumatología del INCMNSZ, por su asesoría en la parte experimental y en el análisis de los resultados y principalmente por su apoyo en todo momento.

A la M en C Irma Beatriz Mitre del Depto. de Bioquímica del INCMNSZ, por su colaboración en el análisis de resultados.

Al Dr. César Ferreira Batista de la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología, UNAM, por su colaboración en la secuenciación de las proteínas.

A mis compañeros del laboratorio: QBP Araceli Martínez, QBP María Teresa Huerta y al QC Carlos Alberto Núñez, por todo su apoyo.

Cuando luchas con enemigos, si sientes que estás estancado y no progresas, arroja fuera tu estado de ánimo y piensa que estás empezando todo de nuevo. A medida que lo hagas con este ritmo, discierne cuando ganar. Esto es “renovarse”. En cualquier caso que sientes que se está produciendo fricción entre tú y los demás, si cambias en ese preciso instante, puedes vencer con una clara ventaja. Esto es “renovarse”.

Miyamoto Musashi

Esta tesis la dedico a mi madre, a mi hermana y a mis hermanos, quienes siempre me han ayudado y apoyado en todos los momentos de mi vida.

Índice	Página
1. Antecedentes	11
1.1 Antecedentes Históricos	11
1.2 Artritis Reumatoide	12
1.3 Anticuerpos asociados con AR	15
1.3.1 Factor Reumatoide	15
1.3.2 Anticuerpos contra proteínas citrulinadas	16
1.4 Papel de la fibrina en AR	17
1.5 Citrulinación	18
1.5.1 Peptidil-arginina-deiminasa (PAD)	19
1.5.2 Consecuencias generales de la citrulinación	21
1.5.3 Especificidad de la PAD	22
1.5.4 Regulación de la PAD	22
1.5.5 Papel fisiológico de la citrulinación	23
1.6 Papel de la citrulinación en artritis inducida por colágena (CIA)	26
1.7 PAD4 y su asociación con AR	26
1.8 Papel de la citrulinación en AR	27
2. Justificación	29
3. Hipótesis	29
4. Objetivos	30
5. Metodología	31
5.1 Obtención de sueros	31
5.2 Cultivos de células HEp-2	31
5.3 Obtención de lisados de células HEp-2	31
5.4 Citrulinación <i>in vitro</i>	32
5.5 Detección de proteínas citrulinadas	32
5.6 Reactividad de los sueros contra proteínas citrulinadas	33
5.7 Purificación de proteínas citrulinadas	33
5.8 Separación de proteínas en E-2D	34
5.9 Tinción con plata	35
5.10 Tinción con azul de Coomassie	36
5.11 Reactividad de los sueros contra proteínas citrulinadas en E-2D	36
5.12 Espectrometría de masas	37
5.13 Determinación de punto isoelectrico (pI)	37

6. Resultados	
6.1 Obtención de las proteínas nucleares y citoplasmáticas de la línea celular HEp-2 y citrulinación <i>in vitro</i>	38
6.2 Reactividad contra proteínas citoplasmáticas de células HEp-2 nativas y citrulinadas <i>in vitro</i>	40
6.3 Reactividad de las muestras seriadas de una paciente con artritis temprana Temprana	43
6.4 Purificación de proteínas citrulinadas reconocidas por el suero Temprana	44
6.5 Reactividad de los sueros de pacientes con artritis temprana contra proteínas del citoplasma purificadas y citrulinadas <i>in vitro</i>	45
6.6 Separación de las proteínas reconocidas por la muestra P83	46
6.7 Separación de las proteínas reconocidas por la muestra P10	47
6.8 Identificación de las proteínas reconocidas	48
6.9 Citrulinación de las isoformas de la enolasa- α	49
6.10 Determinación de pI	51
6.11 Homología con otras proteínas citrulinadas	53
7. Discusión	55
8. Conclusiones	60
9. Bibliografía	61

Índice de Figuras

	Página
1. Articulación inflamada	13
2. Papel de la citrulinación de la fibrina en la patofisiología en AR	17
3. El proceso de la citrulinación involucra la conversión enzimática de arginina a citrulina	21
4. Corrimiento electroforético del lisado de células HEp-2	38
5. Detección de proteínas citrulinadas por inmunopunto con anticuerpos anti-CM	39
6. Mapa proteómico de proteínas citoplasmáticas de células HEp-2 citrulinadas	49
7. Reactividad de los sueros de pacientes con artritis temprana contra proteínas citoplasmáticas de células HEp-2 nativas y citrulinadas <i>in vitro</i>	41
8. Reactividad de las muestras seriadas de una paciente con artritis temprana contra proteínas del citoplasma de células HEp-2 citrulinadas <i>in vitro</i>	43
9. Tinción con plata de las proteínas purificadas	44
10. Reactividad de los sueros P83 y P10 de pacientes con artritis temprana contra proteínas citoplasmáticas citrulinadas	45
11. Mapa proteómico de las proteínas reconocidas por el suero P83	46
12. Mapa proteómico de las proteínas reconocidas por el suero P10	47
13. Secuencia de aminoácidos de la enolasa- α	48
14. Mapa proteómico de las proteínas secuenciadas y teñidas con deep purple	51
15. Índices de expresión de las cuatro isoformas de la enolasa- α	52

Índice de tablas

	Página
1. Criterios revisados por el CAR en 1987 para la clasificación de pacientes con AR	14
2. Resumen de la eficiencia de la PAD sobre estructuras primaria o secundaria del sustrato	22
3. Ubicación de los residuos de citrulina en las isoformas de la enolasa- α	50
4. Determinación de pI de las proteínas secuenciadas	52
5. Homología de los péptidos citrulinados de la enolasa- α con fragmentos de la cadena alfa de la colágena, vimentina y péptidos sintéticos de fibrina	54

Resumen

Introducción: La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune de etiología multifactorial caracterizada por inflamación de las articulaciones y presencia de múltiples autoanticuerpos. El factor reumatoide (FR) ha sido considerado el marcador serológico más utilizado en el diagnóstico de la enfermedad por su sensibilidad y valor predictivo pero tiene baja especificidad. Recientemente el estudio de los anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (APC) ha adquirido gran interés debido a su alta especificidad, alta sensibilidad para el diagnóstico y como predictor de severidad en pacientes con AR, lo cual sugiere un papel importante de estos anticuerpos en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, el o los autoantígenos dominantes no han sido totalmente establecidos.

Objetivo: Identificar los autoantígenos citrulinados reconocidos por los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con artritis temprana y estudiar la posible homología entre los autoantígenos citrulinados identificados.

Metodología: Estudiamos los sueros de 24 pacientes con artritis temprana definida como pacientes con monoartritis, oligoartritis o poliartritis, de menos de un año de evolución. La media de edad fue 40 ± 13.8 años, de los cuales 83.3% fueron mujeres, la media del tiempo de evolución fue 5.3 ± 2.7 meses. Los pacientes reunían en promedio 6 ± 1.3 criterios del Colegio Americano de Reumatología (CAR) para pacientes con AR y tenían en suero títulos altos de anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados (a-CCP) (> 235 U/mL; $N \leq 25$ U/mL). Todos los pacientes con artritis temprana estudiados, evolucionaron posteriormente a AR. Estudiamos además, 12 sueros de sujetos sanos como controles. Probamos la reactividad de los sueros mediante electroinmunotransferencia (EIT) contra fracciones de lisados purificados de citoplasma y de núcleo de células HEp-2 citrulinados *in vitro*. Separamos, mediante electroforesis en dos dimensiones (E-2D) las proteínas reconocidas por los sueros de los pacientes con artritis temprana y posteriormente las teñimos con azul de Coomassie e identificamos mediante EIT. Secuenciamos las proteínas con un sistema de cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas (CL/EM), analizamos y

comparamos los péptidos trípticos que contenían residuos de citrulina con secuencias de la cadena α de la colágena, vimentina y péptidos sintéticos de la fibrina.

Resultados: Identificamos una proteína de 48 kDa, proveniente de la fracción citoplasmática de la línea celular HEp-2 citrulinada *in vitro*, la cual fue reconocida por el suero de 14 de los 24 pacientes con artritis temprana (56.0 %). Sólo 3 de los 24 sueros (0.72%) reconocieron tanto la forma citrulinada como la nativa y ninguno reconoció sólo la forma nativa. Ninguno de los 12 sueros de sujetos sanos reconoció la proteína de 48 kDa en su forma nativa o citrulinada. El mapa de la E-2D y su EIT mostraron que la banda de 48 kDa reconocida por los sueros de los pacientes correspondió a un grupo de 6 proteínas de puntos isoeléctricos entre 5.0 y 5.3. De las seis proteínas identificadas pudimos determinar que cuatro corresponden a isoformas de la enolasa- α , las cuales presentan diferencias en su patrón de citrulinación, excepto en la posición 412 que fue común para las cuatro isoformas. Identificamos dos péptidos de la enolasa- α que tienen homología con aminoácidos de la cadena α de la colágena, localizados cerca del sitio de citrulinación: **XXXAXXXRSXK** y **XSRXXTVXVD**. Identificamos, además, dos péptidos con homología con vimentina: **EXXXXRXNXXVEXX** y **XXIXRXXEXLQ**, y dos péptidos con homología con péptidos sintéticos de la fibrina: **XXXRGXXTXEX** y **XXIXITS**, donde **R** es residuo de citrulina.

Conclusiones: La enolasa- α citrulinada es uno de los autoantígenos dominantes reconocidos por los sueros de los pacientes con artritis temprana. Identificamos cuatro isoformas de la enolasa- α que muestran diferencias en el patrón de citrulinación. Existe reactividad de los sueros de los pacientes con artritis temprana contra las cuatro isoformas de la enolasa- α . Identificamos homología entre residuos de aminoácidos de péptidos de la enolasa- α que contienen citrulina con la cadena α de la colágena, vimentina y péptidos sintéticos de la fibrina. Para establecer la importancia de los residuos de aminoácidos que flanquean a la citrulina, en el reconocimiento por los APC se requieren de estudios más detallados.

Abstract

Introduction: Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by chronic joint inflammation and by presence of various serum autoantibodies. Until recently, rheumatoid factor (RF) had been considered a serologic marker of RA due to its high sensibility and predictive value, albeit with low specificity. The study of antibodies against citrullinated proteins (ACP) has acquired recent interest due to its high specificity for the diagnosis of RA. Even more, ACP are now also considered a powerful serologic marker for the prediction of disease severity. Altogether, these data suggest an important role of ACP in the pathogenesis of RA. Despite of this, the search of a dominant citrullinated autoantigen in RA so far has being unsuccessful.

Objectives: To identify citrullinated autoantigens recognized by antibodies present in sera of patients with early arthritis and to study the structural homology among the identified citrullinated autoantigens.

Methods: We studied 24 serum samples from patients with early arthritis, defined as patients with monoarthritis, oligoarthritis or polyarthritis of less than one year of disease duration. Their mean age was 40 ± 13.8 years, 83 % were females. The mean disease duration was 5.3 ± 2.7 months. Patients met 6 ± 1.3 criteria of the American College of Rheumatology criteria for the classification of RA. They had a mean serum concentration of 235 U/ml anti-cyclic citrullinated peptides antibodies (anti-CCP; normal: ≤ 25.0 U/mL). We studied 12 healthy human donor sera as controls. Reactivity against citrullinated proteins was tested by Western blot using HEp-2 line cell cytoplasm and nucleus lysates previously citrullinated *in vitro*. Protein lysates were resolved by two-dimensional electrophoresis (2-DE) followed by staining with Coomassie blue and incubated with patients's sera by Western blot. Reactive proteins were then sequenced with a liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) system. Tryptic peptides that contained citrulline residues were analyzed and compared with the aminoacid sequences of α -chain collagen, vimentin and syntetic peptides of fibrin.

Results: Fourteen of 24 (56%) serum samples from early arthritis patients strongly recognized an *in vitro* citrullinated protein of 48 kDa present in the cytoplasmic HEp-2 cell lysate. Only 3 serum samples (0.72%) reacted against both the citrullinated and native proteins. No serum from the healthy donors reacted against the 48 kD protein in its native nor citrullinated form. We found that the 48 kD band recognized by early arthritis sera is composed of a group of six proteins with isoelectric points ranging from 5.0 to 5.3. We identified that 4/6 of these six proteins are isoforms of α -enolase, with different citrullination patterns, except for that in the 412 position which is a common citrullinated residue. Two peptides of the α -enolase have homology with: 1) sequences of the α -chain of collagen located near the citrullination site: **XXXAXXXRSXK** and **XSRXXTVXVD**; 2) sequences of vimentin: **EXXXRXNXXVEXX** and **XXIXRXXEXLQ**, and, 3) two synthetic fibrin peptides: **XXXRGXXTXEX** y **XXIXITS**, where R represents a citrulline residue in all instances.

Conclusions: Citrullinated α -enolase is one of the dominant autoantigen recognized by sera from patients with early arthritis. We identified four α -enolase isoforms that have different citrullination patterns. Sera from patients with early arthritis contain antibodies reactive against all four α -enolase isoforms. There is sequence homology among peptides containing citrullinated α -enolase, collagen α -chain, vimentin and synthetic fibrin peptides. Further studies are needed to ascertain the participation of the aminoacids that flank citrulline residues in the reactivity of autoantibodies from patients with early arthritis.

1. Antecedentes

1.1 Antecedentes históricos

La artritis reumatoide (AR) fue descrita por primera vez en 1800, cuando el médico francés Landré-Beauvais reportó nueve casos de mujeres con una forma de reumatismo que la consideró como una variante de la gota y la denominó “*goutte asthenique primitive*”. No obstante, existen evidencias de este padecimiento en diversas pinturas realizadas por Rubens a finales del siglo XVI y a mediados del XVII. En 1818, Brodie observó que el daño se iniciaba en la membrana sinovial. Posteriormente, los descubrimientos de Charcot contribuyeron a diferenciar la gota, la enfermedad articular degenerativa y la AR (Benedek y cols. 1982).

En 1892 Garrod propuso el nombre de AR, el cual sigue vigente hasta nuestros días. Adams en 1873, describió los nódulos subcutáneos previamente asociados a la AR, cuyas características histológicas serían delineadas por Collins en 1937. Billings propuso en 1912 la hipótesis de una etiología infecciosa como causante de padecimiento. Felty por su parte, en 1924 describió cinco casos de una variante de AR acompañada de esplenomegalia y leucopenia, trastorno que a la postre sería denominado con el epónimo de síndrome de Felty propuesto por Hanrahan y Mullar en 1932. El término de AR se aceptó oficialmente en la nomenclatura inglesa en 1922 y en la norteamericana en 1941. En 1953, Caplan describió cambios pulmonares característicos en mineros con AR, síndrome que más adelante se denominaría síndrome de Caplan (Benedek y cols. 1982)

Una de las observaciones más relevantes del siglo pasado, fue la descripción de Waaler en 1937, quien mostrando que los eritrocitos de carnero recubiertos con anticuerpos eran aglutinados por el suero de los pacientes con AR y Rose en 1948 comprobó el hallazgo y en 1949 Coggeshall propuso el término de “Factor Reumatoide” (FR) para definir el fenómeno descrito. Posteriormente el factor reumatoide fue identificado como un autoanticuerpo. A

mediados de los años 50's el FR fue caracterizado como una molécula de inmunoglobulina de isotipo IgM dirigida contra la fracción cristalizante (Fc) de la molécula de IgG. En la actualidad a esta molécula se le reconoce como FR clásico (Kunkel y cols. 1959; Fraser 1998).

1.2 Artritis Reumatoide

La AR es una enfermedad autoinmune, generalizada, de etiología multifactorial y de distribución mundial. Su prevalencia está alrededor del 1.0 % de la población adulta, aunque este porcentaje depende en gran medida de cohortes estudiadas. La enfermedad es más frecuente en mujeres que en varones (2-3 mujeres por cada varón afectado). La mayor incidencia ocurre en mujeres entre los 40 y los 60 años de edad (Hochberg y cols. 1990).

Los estudios muestran que los individuos afectados tienen cierta predisposición genética. Los antígenos HLA de clase II, DR1 y DR4 son los que presentan mayor asociación con la AR y la hipótesis más aceptada para el desarrollo de la enfermedad, es que un agente infeccioso puede ser el factor iniciador. Lo anterior se basa en que algunas infecciones como la enfermedad de Lyme, las infecciones por Parvovirus B19 y la rubéola producen cuadros de poliartritis muy similares a la AR (Alarcón 1981; Wordsworth 1991; Deighton y col. 1991; Pascual 1998).

Aunque puede afectar diversos órganos, la AR se caracteriza por la inflamación de la membrana sinovial de las articulaciones diartrodiales, de las vainas tendinosas y de las bursas sinoviales de deslizamiento. El tejido sinovial inflamado tiene características de destrucción local que invade y daña a las estructuras de la articulación, resultando en la pérdida de la función (fig. 1). La inflamación lleva a la destrucción de la articulación, responsable de la discapacidad que produce la enfermedad (Pascual 1998). El diagnóstico de la AR se fundamenta primordialmente en las manifestaciones clínicas.

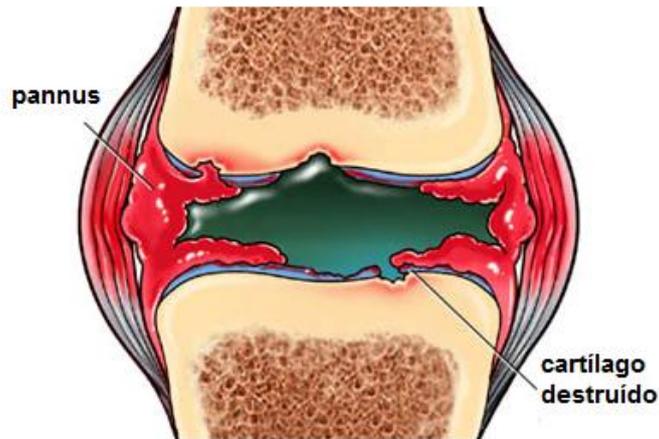


Fig. 1 Articulación inflamada

El apoyo para el diagnóstico se basa en la detección del FR de isotipo IgM el cual tiene una sensibilidad de 66.4% pero es poco específico (82.1%) para AR porque puede presentarse en infecciones crónicas y en otras enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso generalizado (LEG), la enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC) y el síndrome de Sjögren primario (SSP), a títulos inclusive mayores que en AR. Algunos reportes muestran que también se puede detectar el FR en población adulta y en sujetos sanos (Galen y cols. 2004; Shelleken y cols. 1999; Xiaofenz y cols. 2003).

Para el diagnóstico de la AR, el paciente debe cumplir al menos cuatro de los siete criterios de clasificación para AR propuestos por el colegio americano de reumatología (CAR) en 1987 (Arnet y cols. 1988). Los criterios de 1 al 4 deben estar presentes al menos durante seis semanas. La sensibilidad de los criterios es del 91.2 % y su especificidad del 89.3% (tabla 1). Sin embargo, estos criterios se establecieron con base en las características clínicas de pacientes con AR que presentaron 10 años de progresión en la enfermedad, por ello, se ha cuestionado su utilidad en las fases tempranas de la misma, en cuyo caso la sensibilidad y especificidad son de 80.9% y 88.2 % respectivamente.

Criterio	Definición
1. Rigidez matutina	Rigidez matutina en las articulaciones y alrededor de ellas, por lo menos de una hora de duración antes de la mejoría máxima.
2. Artritis de dos o más articulaciones	Al menos tres áreas articulares deben tener simultáneamente hinchazón de tejidos blandos o derrame (no sólo crecimiento óseo) observada por un médico. Las 14 áreas articulares posibles son: interfalángicas proximales (IFP), metacarpofalángicas (MCF), muñecas, codos, rodillas, tobillos y metatarsfalángicas (MTF) derechas e izquierdas, respectivamente.
3. Artritis de las articulaciones de las manos	Al menos un área articular inflamada (según se describe previamente) de las siguientes: carpo, MCF e IFP.
4. Artritis simétrica	Afección simultánea de las mismas áreas articulares en ambos lados del cuerpo.
5. Nódulos reumatoides	Nódulos subcutáneos sobre las prominencias óseas, superficies extensoras o regiones yuxtaarticulares, observados por un médico.
6. Factor Reumatoide en suero	Demostración de cantidades anormales de "factor reumatoide" por el método que sea positivo en menos del 5% de la población de controles normales.
7. Cambios radiológicos	Cambios radiológicos típicos de artritis reumatoide en la radiografía PA de manos y muñecas, los cuales deben incluir erosiones o descalcificación inequívoca localizada o más acentuada en zonas adyacentes a las articulaciones afectadas.

Tabla 1. Criterios revisados por el CAR en 1987 para la clasificación de pacientes con AR
(Arnet y cols. 1988)

En la última década, se ha propuesto que el tratamiento de la AR debe ser intensivo y temprano, con los llamados fármacos modificadores de la enfermedad (FMDE), si se quiere evitar el daño radiológico y el deterioro funcional. Para ello, es necesario diagnosticar tempranamente esta entidad, la cual en etapas iniciales tiene ciertas peculiaridades clínicas y serológicas.

1.3 Anticuerpos asociados con la AR

Una amplia variedad de autoanticuerpos pueden ser detectados en el suero de pacientes con AR. El FR ha sido el marcador serológico más utilizado en el diagnóstico de la ésta enfermedad. Sin embargo, actualmente la detección de anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (APC) ha cobrado interés debido a su alta especificidad (cerca al 100%) en pacientes con AR, además de su participación en la patogénesis de la enfermedad. (Lundberg y cols. 2005)

Los anticuerpos dirigidos contra proteínas citrulinadas que más se han asociado con la AR son: anticuerpos anti-factor antiperinuclear (APF) y anti-queratina (AKA), ambos dirigidos contra filagrina citrulinada (Sebbag y cols. 1995); anticuerpos anti- α los cuales reconocen vimentina citrulinada (Vossenar y cols. 2004) y anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados (anti-CCP) (Galen y cols. 2004). Estos últimos tienen una sensibilidad mayor del 80 % y especificidad del 98 % en pacientes con AR (Shelleken y cols. 1999). Además de su alta especificidad, se presentan en etapas tempranas de la enfermedad.

1.3.1 Factor Reumatoide

El FR es un grupo de inmunoglobulinas de isotipos IgG, IgA o IgM dirigidas contra la fracción Fc de los anticuerpos de isotipo IgG (FR clásico). La determinación del FR de isotipo IgM es de utilidad en el diagnóstico de la AR, además de su valor pronóstico. Títulos altos de FR de IgA e IgG se han asociado con mayor daño articular, progresión radiológica, incapacidad funcional y con la presencia de manifestaciones extra articulares (Kroot y cols. 2000).

1.3.2 Anticuerpos contra proteínas citrulinadas

En 1964 Nijenhuis y Mandema describieron por primera vez los anticuerpos APF (Nienhuis y cols. 1964) y en 1979 Young y cols. mostraron que los sueros de pacientes con AR reaccionaban con el epitelio de esófago de rata. En su trabajo Young y sus colaboradores definieron a estos anticuerpos como anticuerpos AKA (Young y cols. 1979). Ambos autoanticuerpos, detectados mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta, mostraron alta especificidad para la AR (entre 90 y 98%). Sin embargo, debido a la sensibilidad limitada (40-55 %), a las dificultades técnicas para su determinación y a la falta de estandarización de las técnicas utilizadas, el estudio de estos autoanticuerpos fue exclusivo de trabajos de investigación y laboratorios de inmunología especializadas.

En 1995 Sebbag y cols. mostraron que tanto los anticuerpos AKA como los anticuerpos APF reconocen moléculas relacionadas con la filagrina y la profilagrina. Posteriormente, observaron que los sueros de pacientes con AR presentaban una mayor reactividad contra profilagrina *in vitro* (Sebbag y cols. 1995). Sin embargo, en estudios posteriores en los que se utilizó filagrina recombinante o fragmentos de péptidos sintéticos de profilagrina, los sueros de pacientes con AR no mostraron reactividad (Girbal-Neuhaser y cols. 1999). Lo anterior sugirió que la inmunogenicidad de la filagrina y la profilagrina estaba relacionada con modificaciones post-traduccionales (MPTs). En el mismo año, Girbal-Neuhaser y cols. demostraron que el antígeno reconocido por los anticuerpos AKA/APF era la profilagrina citrulinada (Girbal-Neuhaser y cols. 1999). Sin embargo, un estudio detallado reveló que no hay expresión *in vivo* de profilagrina en tejidos sinoviales (Masson-Bessiere y cols. 2001), lo que excluyó la posibilidad de que el antígeno reconocido *in vivo* por los AKA/APF fuera la profilagrina, ya que la inflamación sólo ocurre en las articulaciones y no en la epidermis, sitio en el cual la profilagrina se expresa de manera abundante (Masson-Bessiere y cols. 2001). Trabajos posteriores mostraron que tanto la cadena α como β de la fibrina citrulinada son los antígenos reconocidos por los

anticuerpos APC y que están presentes en pacientes con AR (Shellekens y cols. 1998).

1.4 Papel de la fibrina en AR

Frecuentemente, se encuentran placas de fibrina en tejido sinovial debido, a que bajo ciertas condiciones fisiológicas, pequeñas cantidades de fibrinógeno y otras proteínas procoagulantes penetran la pared capilar y viajan a través del espacio intersticial, en donde el fibrinógeno es fragmentado en péptidos de fibrina produciendo microplacas locales. Estas microplacas son digeridas por enzimas y posteriormente endocitadas por macrófagos. En términos generales, existe un balance entre la presencia y ausencia de moléculas de fibrina en el intersticio (balance de coagulación y fibrinólisis) el cual puede estar alterado bajo circunstancias patológicas como en AR (Rubin y cols. 2004).

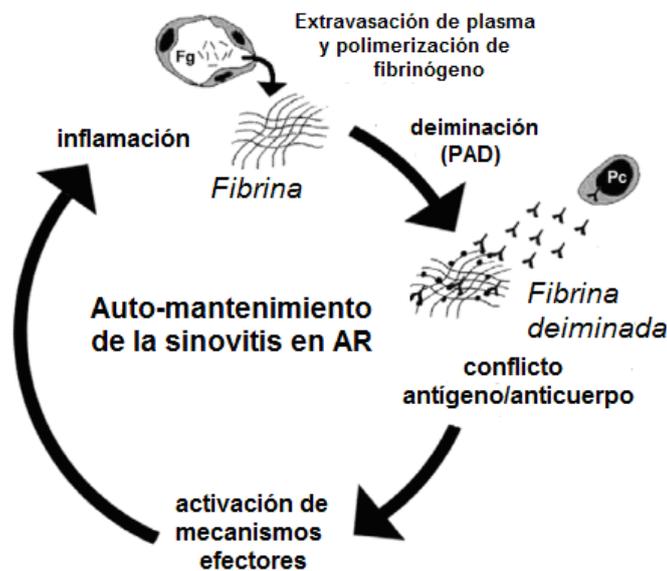


Fig. 2 Papel de la citrulinación de la fibrina en la patofisiología de AR. Después de la citrulinación, la fibrina se convierte en un blanco para la producción de autoanticuerpos específicos, los cuales son producidos localmente. Los complejos inmunes (antígeno/anticuerpo) permiten la activación de mecanismos efectores que involucran componentes del complemento y/o receptores Fc (FcR) lo que induce efectos proinflamatorios, los cuales permiten la extravasación y polimerización de fibrinógeno. Además, provocan la formación de nuevos depósitos de fibrina en el tejido, mismos que se convierten en sustratos de la peptidil-arginina-deiminasa (PAD) expresada localmente. Este fenómeno cierra un círculo que contribuye al mantenimiento del proceso inflamatorio en AR (Rubin y cols. 2004).

La fibrina polimerizada es degradada por la plasmina, una serin-proteasa que hidroliza cerca de los residuos de aminoácidos básicos (K y R). Cuando el residuo de R es modificado debido a la conversión a citrulina, se reduce el número de sitios de corte, por lo que la cantidad de polímeros de fibrina se incrementa. (Sebbag y cols. 2004). La citrulinación de la fibrina confiere antigenicidad a la molécula y permite que sea reconocida por los anticuerpos APC (Fig. 2) (Rubin y cols. 2004). La activación de la respuesta inmune por la presencia de placas de fibrina citrulinada puede llevarse a cabo por dos vías, las cuales serán tratadas posteriormente.

Efectos mediados por antígenos no específicos. El fibrinógeno puede activar a la inmunidad innata por coestimulación del complejo CD11c/CD18, TLR-4 y CD14 presentes en los macrófagos. En respuesta a la estimulación estas células producen diversas citocinas pro-inflamatorias, como: IL-2, IL-8, IL-12 y TNF- α , produciendo un proceso inflamatorio local (Rubin y cols. 2004).

Efectos mediados por antígenos específicos: Las cadenas α y β de la fibrina son inmunogénicas, por lo que estimulan una respuesta inmune adaptativa causando inflamación (Masson y cols. 2001).

1.5 Citrulinación

Las MPTs son cambios químicos que sufren las proteínas después de ser sintetizadas. Una de estas MPTs es la citrulinación (conversión del residuo arginina a citrulina), catalizada por la enzima peptidil-arginina-deiminasa (PAD). El estudio de esta modificación ha adquirido gran interés, debido a su participación en diversos procesos tanto fisiológicos como patológicos. Dentro de los procesos fisiológicos se incluye la diferenciación terminal de células epiteliales, la regulación en la expresión de genes y la apoptosis. Por otro lado, en los procesos patológicos las proteínas citrulinadas se han relacionado con la progresión de la enfermedad en AR, esclerosis múltiple y Alzheimer, entre otros.

Las MPTs (vg. fosforilación, glicosilación, citrulinación, etc.) pueden influir directamente sobre la estructura y función de las proteínas e incrementar la diversidad funcional del proteoma. Además, son procesos biológicos comunes que alteran regiones específicas de las proteínas después de su síntesis. Prácticamente casi todas las proteínas sufren alguna MPT, debido a que casi todos los aminoácidos pueden ser modificados.

La conversión de arginina a citrulina en las proteínas, es capaz de activar a la respuesta inmune. Dicha conversión da como resultado un cambio en la carga del aminoácido. La arginina es un aminoácido fuertemente básico ($pI=10.76$) debido a la presencia del grupo guanidino que puede ser fácilmente protonado a pH fisiológico (7.2-7.4). La eliminación del grupo imino (transformación referida como deiminación o citrulinación) es una reacción enzimática catalizada por la enzima PAD. La citrulina resultante carece de carácter básico; es un residuo neutro similar a la asparagina (N) o glutamina (Q). (György y cols. 2006).

A nivel proteico, la reacción provoca una reducción de alrededor de 1 Da por cada arginina modificada. La carga positiva se pierde, por lo que el punto isoeléctrico (pI) también se ve modificado. Las interacciones con otras proteínas pudieran ser también alteradas (van Venrooij & Pruij 2000, Tarcsa y cols. 1996).

1.5.1 Peptidil-arginina-deiminasa (PAD)

El proceso de deiminación de proteínas es catalizado por una familia de enzimas dependientes de calcio, conocidas como PADs. Se han identificado cinco isoenzimas. Su organización genómica, localización subcelular y su expresión en diferentes tejidos no se conoce totalmente.

Los genes que codifican para las PADs (*padi*) están localizados en el cromosoma 1p36.13; el tamaño de la región es de 300 Kb (Chavanas y cols. 2004). Los *padi-1*, *-3*, *-5* y *-6* están cercanos en una región de 160 kb. El *padi-2* se

encuentra separado de los otros cuatro, es el más largo de esta familia de genes y se transcribe en dirección opuesta. Esta organización genómica está conservada entre las especies. La localización y dirección de los genes, la longitud de las secuencias intergénicas y las secuencias codificantes son similares en ratón y humano (Chavanas y cols. 2004).

Las isoenzimas de la PAD están ampliamente distribuidas en los tejidos de mamíferos. La PAD1 se expresa predominantemente en la epidermis y útero, la PAD3 en folículos, en tanto que la PAD4 en neutrófilos y eosinófilos. La expresión de la PAD6 ha sido detectada en ovarios, testículos y leucocitos de sangre periférica. La PAD2 es el miembro más ubicuo de la familia, se expresa en músculo esquelético, bazo, cerebro, glándulas salivales, útero, etc.

El mecanismo propuesto para la actividad de las PAD es el siguiente; el residuo cisteína (C) localizado en el sitio activo de la enzima reacciona con el grupo guanidino de arginina (R), y establece un aducto tetrahedral como un estado intermediario de transición, mientras el amonio es liberado. Posteriormente el aducto es cortado por un ataque nucleofílico de una molécula de agua. El paso final es la regeneración del residuo de cisteína, resultando en la formación de un grupo -ceto, formando una amina primaria (Fig. 3a) (Arita y cols. 2004).

Una consecuencia interesante del mecanismo de reacción de la PAD es que no sólo R, sino que también R metilada (con el grupo metilo en la amina primaria) pueden ser transformadas en citrulina (fig. 3b). En este caso el producto liberado es una metil-amina (Wang y cols. 2004).

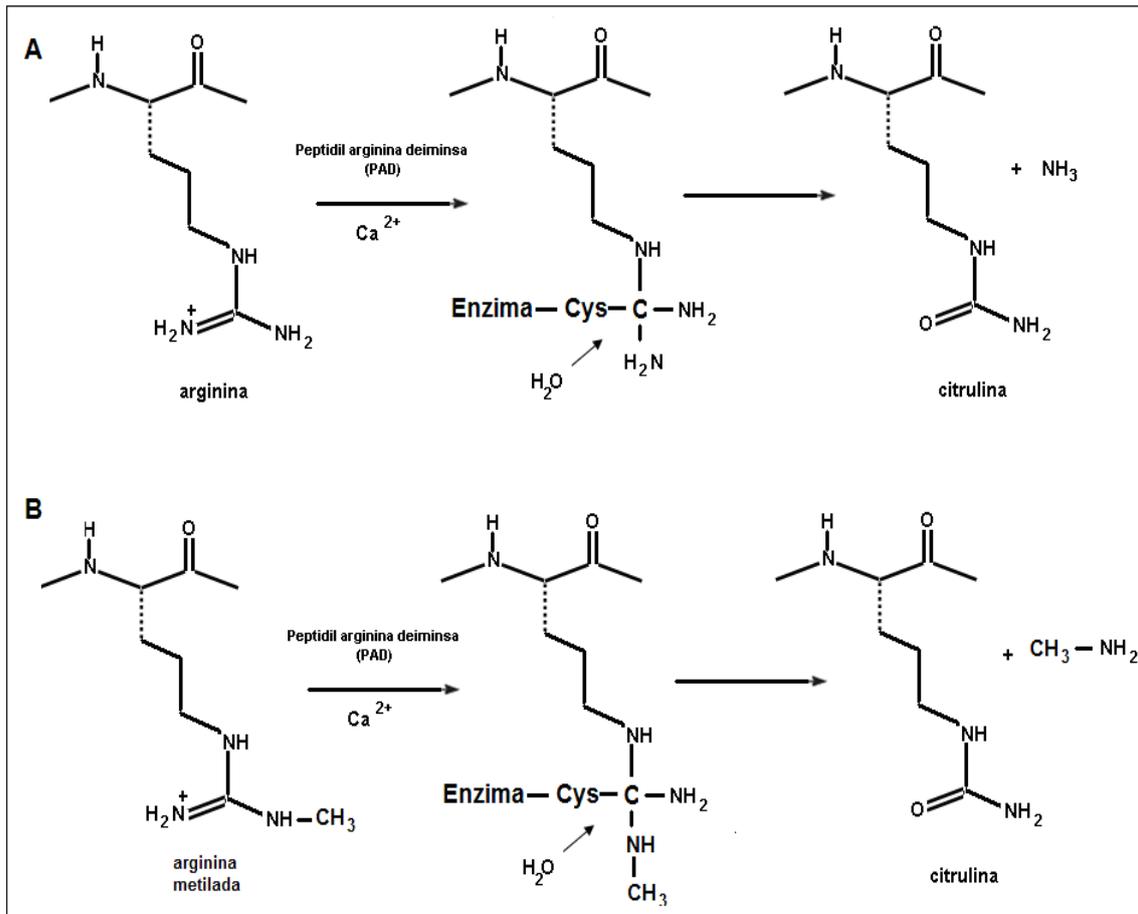


Fig. 3 El proceso de citrulinación involucra la conversión enzimática de arginina a citrulina. La enzima que cataliza esta reacción es la peptidil-arginina-deiminasa (PAD). Durante la reacción, la arginina es atacada por el residuo Cys de la enzima formando un aducto tetrahedral. Después el aducto es cortado por el ataque nucleofílico de una molécula de agua que regenera el residuo Cys y forma el grupo ceto.

1.5.2 Consecuencias generales de la citrulinación.

El proceso de citrulinación puede cambiar la estructura primaria, secundaria y terciaria de las proteínas. Análisis *in vitro* revelan que un alto grado de citrulinación podría desnaturar las proteínas. Estudios realizados con ticohialina y filagrina muestran que la modificación del 5.0 % de los residuos de R provocan la destrucción de la estructura terciaria y modificaciones mayores del 10.0 % de los residuos de R causan la pérdida completa de la estructura, provocando la desnaturación de la proteína. Este fenómeno es atribuido a la pérdida de residuos básicos los cuales resultan en la alteración de la distribución de carga. Sin embargo, *in vivo* no es posible aceptar que la citrulinación sea un proceso de desnaturación. En general se acepta que la modificación altera la

estructura de la proteína y algunas veces resulta en la pérdida de organización y confiere una configuración más abierta (Tarcza y cols. 1997).

1.5.3 Especificidad de la PAD

Estudios *in vitro* sugieren que en teoría, cualquier residuo de arginina pudiera ser citrulinado aunque con diferentes parámetros cinéticos. Algunos de los factores que determinan la cinética de deiminación se resumen en la Tabla 2

Estructura primaria		Estructura secundaria	
	Grado de citrulinación		Grado de citrulinación
N-R-E-C	Lentamente citrulinado, 10% de eficiencia	α -hélice	Pocas veces citrulinado
N-R-D-C	Rápidamente citrulinado, 100% de eficiencia	Giro- β	Regularmente
R próximo a N-terminal	Muy pocas veces citrulinado	Desordenado	Rápidamente
N-R-R-C	R próximo a C-terminal pocas veces citrulinado, excepto en el caso de PBM	Lámina- β	No hay reportes
N-R-R-P-C	Nunca se citrulina		

Tabla 2. Resumen de la eficiencia de la PAD sobre estructura primaria o secundaria del sustrato (Tarcza y cols. 1996). N y C = amino y carboxi terminales, respectivamente; E=ácido glutámico, D= ácido aspártico; R=Arginina; P=prolina y PBM= Proteína básica de la mielina

1.5.4 Regulación de la PAD

Un factor importante en la activación de la PAD es la unión del ión calcio, además, cada isoenzima requiere un pH diferente para su activación en la epidermis. La citrulinación *in vitro* sólo se observa en presencia de concentración alta de calcio (Mechin y cols. 2005). Bajo condiciones fisiológicas la PAD se encuentra inactiva debido a que la concentración de calcio se encuentra entre 10^{-8} y 10^{-6} M (Takahara y cols. 1986), lo que sugiere que la citrulinación ocurre sólo bajo ciertas condiciones como apoptosis o en la diferenciación terminal de las células de la epidermis. En ambos procesos la concentración de calcio se ve incrementada, lo cual permite la activación de la PAD. Recientemente se han

implicado otros procesos celulares como regulación de genes (Wang y cols. 2004).

Por otra parte, poco se conoce de la regulación de genes de estas enzimas. Estudios recientes han mostrado que *padi2* puede ser inducido por 17β -oestradiol. Durante el ciclo menstrual, la actividad de la PAD2 cambia en las glándulas pituitarias y en el útero (Shensu y cols. 1989; Takahara y cols. 1992).

1.5.5 Papel fisiológico de la citrulinación

La citrulinación está implicada en varios procesos fisiológicos incluyendo diferenciación terminal de la epidermis y apoptosis.

Proteínas de citoesqueleto

Citoqueratina

Es una proteína constituyente de los filamentos intermedios producida por queratinocitos. Consiste de segmentos de α -hélice y giros- β (éste último puede ser fácilmente citrulinado). Además, los queratinocitos producen otras proteínas estructurales importantes como la filagrina y loricrina. Durante la diferenciación terminal, los queratinocitos viajan de capas basales del epitelio a capas superiores antes sufrir muerte celular. Durante este proceso el medio ambiente intracelular aumenta la concentración de calcio que gradualmente activa PAD 1, 2 y 3 (Vossenaar y cols. 2003). En la epidermis la citrulinación se lleva acabo sobre la filagrina y las queratinas K1 y K10 (isoformas basales de la citoqueratina) (Shensu y cols. 1996; Akiyama y cols. 1999).

Filagrina

Es sintetizada como una molécula grande, llamada profilagrina, y almacenada en las células en un estado alto de fosforilación. Durante la diferenciación terminal ocurren varias MPTs entre las que se incluyen: citrulinación y defosforilación. Una vez citrulinada, la profilagrina adquiere una estructura más abierta y desordenada lo cual facilita su proteólisis (Shensu y cols. 1996; Akiyama y cols. 1999). Algunos estudios han mostrado que un alto nivel de citrulinación de la profilagrina ayuda al corte a través de proteasas en aminoácidos que son osmóticamente activos y contribuyen a la hidratación de la piel (Harding y cols. 1983; Scout y cols. 1982).

Vimentina

La vimentina es otra proteína constituyente de los filamentos intermedios y se expresa en múltiples células. En contraste, con los microtúbulos de la actina, los filamentos de vimentina son muy estables, tienen una red molecular menos dinámica y su regulación en el proceso de polimerización y depolimerización aún no ha sido totalmente elucidada. Algunos mecanismos propuestos incluyen la fosforilación/defosforilación y la citrulinación. El dominio principal de la vimentina contiene varios giros- β que pueden ser fácilmente citrulinados. Como resultado de la citrulinación, la vimentina pierde la capacidad de polimerizarse, lo cual significa que las argininas son esenciales en la formación de los filamentos de vimentina (Inagaky y cols. 1987). Durante la apoptosis, cuando la concentración de Ca^{2+} es muy alta, la actividad de la PAD se incrementa y da como resultado la pérdida completa de la red de filamentos intermedios de vimentina, debido al alto grado de citrulinación. Este mecanismo pudiera jugar un papel importante en los cambios morfológicos asociados con apoptosis (Asaga y cols. 1998).

Proteína básica de mielina (PBM)

La PBM es sintetizada por células oligodendrogliales. Las vainas de mielina consisten de dos componentes, uno lipídico y otro proteico. Las interacciones lípido-proteína son principalmente de tipo iónicas entre cargas negativas (fosfatidilserina y ácido siálico contenido en los gangliósidos) y proteínas básicas (PBM, lipofilina). Cualquier alteración en el pl de estas proteínas puede causar cambios dramáticos en la interacción con los lípidos (Boggs y cols. 1999).

La PBM es sintetizada en varias isoformas que después sufren MPTs, tales como, deaminación, citrulinación, formación de sulfóxido, metilación y fosforilación (Pritzker y cols. 2000). La citrulinación de la PBM reduce las interacciones con las cargas negativas de la fosfatidilserina debido a la pérdida de residuos básicos. La PBM citrulinada no permite la formación de vainas compactas y funcionales como lo demuestran Beniac y sus colaboradores (Beniac y cols. 2000).

Sustratos nucleares

En el núcleo se han identificado como los antígenos más importantes, a las histonas H2A, H3 y H4, además de la nucleofosmina B23. La citrulinación de histonas es causada por la PAD4 que se encuentra localizada en el núcleo de los granulocitos (Nakashima y cols. 2002). En su estudio, Wang muestra además que la PAD4 regula la metilación de los residuos de arginina presentes en las histonas mediante la conversión de arginina metilada a citrulina. Además, la actividad de la PAD4 está relacionada con la regulación transcripcional de genes en respuesta a estrógenos en células MCF-7. Estos resultados sugieren que la PAD4 modula la expresión de genes por la metilación de arginina y citrulinación de histonas (Wang y cols. 2004).

1.6 Papel de la citrulinación en artritis inducida por colágena (CIA)

Trabajos recientes en modelos de artritis inducida por colágena tipo II (CII), muestran la participación de la citrulinación en la respuesta autoinmune, Lundberg demostró en el modelo de rata Lew.1AV que la citrulinación del colágena es un potente mecanismo para incrementar la autoreactividad y que los anticuerpos APC presentan reactividad cruzada contra colágena citrulinada y colágena nativa. Además, la severidad de la artritis correlaciona con la expresión de PAD4, en el infiltrado de células mononucleares y con la cantidad de colágena citrulinada. También examinó la capacidad de las proteínas endógenas citrulinadas para romper la tolerancia inmunológica y observó que la citrulinación de antígenos no inmunogénicos como la albúmina de suero de rata induce la formación de anticuerpos contra la proteína citrulinada con reactividad cruzada contra la proteína no modificada en todos los puntos investigados (Lundberg y cols. 2005).

1.7 PAD4 y su asociación con AR

Suzuki y cols. en el 2003 estudiaron en una población japonesa, mediante análisis de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs), la asociación entre haplotipos funcionales de *padi4* con AR. Identificaron cuatro haplotipos de *padi4*, de los cuales 1 y 2 tuvieron una frecuencia del 82%, en tanto que 3 y 4 del 18 %. El 32% de los pacientes con AR presentaron el haplotipo 2, en comparación con el 25% de sujetos sanos ($p=0.000008$) (Suzuki y cols. 2003).

La razón por la cual el haplotipo 2 de la *padi4* puede incrementar la susceptibilidad para AR no se conoce, sin embargo, se sabe que el tiempo de vida media del RNAm del haplotipo 2 es de 11.6 min y el del haplotipo 1 es de sólo 2.1 min por lo que la susceptibilidad pudiera ser explicada por la alta posibilidad de traducción de la PAD, resultando en una mayor cantidad de enzima y consecuentemente en un aumento en la citrulinación de proteínas (fibrinógeno ó vimentina), lo cual pudiera estimular tanto la respuesta innata

como la adaptativa, permitiendo de esta manera el desarrollo de la inflamación crónica (Suzuki y cols. 2003). El estudio de Suzuki ha generado un gran interés, sin embargo, el fenómeno no ha sido corroborado en estudios realizados en poblaciones con AR de Francia, Reino Unido y España (Caponi y cols. 2005, Barton y cols. 2004, Martínez y cols. 2005). Sólo un estudio realizado en población Coreana confirmó la asociación (Kang y cols. 2006).

1.8 Papel de la citrulinación en AR

Estudios recientes han mostrado que la colágena humano tipo I (hCI) y II (hCII) son reconocidas por los APC tanto en su forma nativa como citrulinada. En un estudio realizado por Burkhardt, mostraron que el 44% de los sueros estudiados de pacientes con AR reconocen un péptido inmunodominante de la hCII que comprende los aminoácidos 354 al 369 (Burkhardt y cols. 2005.).

En pacientes con AR los anticuerpos anti-hCII se encuentran presentes comúnmente pero carecen de valor diagnóstico. Fragmentos del hCII obtenidos por digestión con bromuro de cianógeno (CNBr), llamados CB10 y CB11, son sustratos para la detección de anticuerpos presentes en pacientes con AR. De acuerdo al trabajo publicado por Cook en el 2004, la sensibilidad de los anticuerpos contra CB10 es del 88% comparada con el 24% de los anticuerpos contra hCII en pacientes con AR (Cook y cols. 2004).

Recientemente, se observó que el (hCI) es uno de los autoantígenos importantes en pacientes con AR. También se determinó que el hCI es uno de los sustratos de las PADs y que la citrulinación del hCI está fuertemente correlacionada con AR. Además, el suero de pacientes con AR que muestran reactividad contra la cadena $\alpha 1$ y $\alpha 2$ del hCI citrulinada presentan una sensibilidad del 32% y especificidad del 99% (Suzuki y cols. 2005). En este mismo trabajo se observó una correlación mayor entre el nivel de anti-CCP y anti-CI citrulinada que entre anti-PCC y anti-CII citrulinada (Suzuki y cols. 2005).

Otros anticuerpos importantes son los anticuerpos contra el antígeno Sa los cuales son altamente específicos para AR y pueden ser detectados en aproximadamente el 40% de pacientes con AR (Menard y cols. 2000). El antígeno Sa es identificado como una doble banda de proteína de 50 kDa. Se encuentra en placenta y en tejido sinovial de pacientes con AR. En el 2004 Vossenaar y cols. mostraron que el antígeno reconocido por los anticuerpos anti-Sa es la vimentina citrulinada (Vossenaar y cols. 2004). Posteriormente, Boire estudio una cohorte de pacientes con poliartritis temprana. Los anticuerpos anti-Sa estuvieron presentes en 45% de los pacientes, los cuales desarrollaron manifestaciones severas a los 30 meses (Boire y cols. 2005).

Recientemente, se ha demostrado que la presencia de anticuerpos contra proteínas citrulinadas así como la expresión de PAD4 preceden las características clínicas de la AR (Nielen y cols. 2004, van der Helm-van y cols. 2005, Majka y cols. 2008, Jorgensen y cols. 2008, Vossenaar y cols. 2003, Chang y cols. 2005). Lo cual, sugiere de manera importante que los anticuerpos contra proteínas citrulinadas son marcadores de eventos específicos que dan lugar al inicio de la autoinmunidad en AR (György y cols. 2006, Harris y cols. 2008). Por otro lado, aunque hay una gran diversidad de antígenos citrulinados que son reconocidos, existe la posibilidad de que dichos antígenos compartan cierta homología, lo cual ayudaría a explicar la especificidad similar de los anticuerpos en AR contra diferentes proteínas citrulinadas como colágena, vimentina y fibrina

En el presente trabajo, realizamos el análisis de un grupo de proteínas citrulinadas de 48 kDa reconocidas por los anticuerpos presentes en el suero de pacientes con AR temprana. Dichas proteínas correspondieron a isoformas de la enolasa- α . Encontramos que los anticuerpos anti-enolasa- α tienen especificidad parecida a los anticuerpos anti-colágena, anti-vimentina y anti-fibrina para AR. Además realizamos la comparación de péptidos derivados de las isoformas de la enolasa- α citrulinados con péptidos de la cadena α de colágeno, vimentina y péptidos sintéticos de la fibrina también citrulinados.

2. Justificación

Los APC tienen una especificidad de 98.0 % en pacientes con AR lo cual sugiere un papel importante de dichas proteínas en la patogénesis de la enfermedad. Recientemente se han descrito nuevos autoantígenos en AR, todos ellos contienen residuos de citrulina y varían en su especificidad y sensibilidad. Lo anterior, sugiere que dichos autoantígenos pueden tener alguna característica en común que permita el reconocimiento por los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con AR.

3. Hipótesis

Existe homología entre los epítopes antigénicos de las proteínas citrulinadas reconocidas por los anticuerpos de pacientes con artritis temprana.

4. Objetivos

- Identificar anticuerpos contra proteínas citrulinadas y proteínas nativas en pacientes con artritis temprana
- Caracterizar las proteínas citrulinadas reconocidas por los anticuerpos de los pacientes con artritis temprana
- Identificar homología entre las proteínas citrulinadas que sean detectadas por anticuerpos de pacientes con artritis temprana

5. Metodología.

5.1 Obtención de sueros

Se obtuvo el suero de 24 pacientes con artritis temprana, definida como pacientes con monoartritis, oligoartritis o poliartritis, de menos de un año de evolución. La media de edad fue 40 ± 13.8 años, de los cuales 83.3% fueron mujeres. La media del tiempo de evolución fue 5.3 ± 2.7 meses. Los pacientes tuvieron en promedio 6 ± 1.3 criterios para AR del CAR, y títulos positivos de anticuerpos anti-CCP (>235 U/mL). Además, se obtuvo el suero de 12 donadores sanos (8 mujeres y 4 hombres) del banco de sangre del INCMNSZ, negativos para sífilis, hepatitis B y VIH.

5.2 Cultivos de células HEp-2

Se cultivaron células HEp-2 en medio RMPI-1640 (GIBCO) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (GIBCO) decomplementado. Los cultivos se mantuvieron a 37°C con 70% humedad y 5% de CO₂ en una incubadora Napco 4200 (Applianced comp. EEUU).

5.3 Obtención de lisados de células HEp-2

Las células HEp-2 se cultivaron durante tres días, posteriormente se lavaron con 25mL de PBS a 4°C. Una vez lavadas, se colocó 1.0 mL de PBS dentro de la caja de cultivo y se despegaron las células con una espátula de plástico (Corning Inc.). Posteriormente se transfirió todo el líquido a tubos de microcentrifugas (eppendorf) de 1.5 mL. Se centrifugó la suspensión de células a 3000 rpm durante 5 min a 4°C (centrifuga Hermle Z323). Se eliminó el sobrenadante mediante decantación, se deshizo el paquete con golpes suaves en el tubo y se adicionaron 100 µL de amortiguador A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM DTT), se homogenizó la suspensión y se congelaron los tubos en hielo seco/acetona por 10 min. Se descongeló a TA y se

resuspendió suavemente la suspensión para eliminar los grumos. Se evaluó el estado de los núcleos mediante tinción de azul de tripano (mezcla 1:1) y observación en un microscopio invertido Zeiss. Se empaquetaron los núcleos mediante centrifugación a 3500 rpm a 4°C por 10 min. Los sobrenadantes que corresponden a la fracción citoplasmática se transfirieron a un tubo nuevo de microcentrífuga y se almacenaron a -20° C hasta su uso.

Por otra parte, el botón de núcleos se homogenizó con golpes suaves del tubo, se resuspendió en 50 µL de amortiguador B (20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 mM KCl, 20% glicerol, 0.2 mM EDTA, 1mM DTT y 0.5mM PMSF) y se incubó por 30 min a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm a 4°C por 20 min. El sobrenadante que corresponde a la fracción nuclear, se transfirió a otro tubo de microcentrífuga y se almacenó a -20° C hasta su uso.

5.4 Citrulinación *in vitro*

Se diluyeron 100 µg de proteína en 120 µL de amortiguador de PAD (para una concentración final de 0.86 µg de proteína/µL de amortiguador 0.1 M Tris-HCl pH 7.4, 10mM CaCl₂ y 5mM DTT) y se adicionaron 5 µL de PAD2 (0.19 mg/mL) de músculo esquelético de rata (SIGMA) (0.5 UPAD/mg de proteína). Se incubó por 3 horas a 55°C y se detuvo la reacción con la adición de 0.5 M EDTA para una concentración final de 20 mM.

5.5 Detección de proteínas citrulinadas

Las proteínas citrulinadas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% y se realizó electroinmunotransferencia (EIT). Posteriormente, incubó la membrana toda la noche a 37°C con una dilución 1:1 del reactivo A y B para la modificación de citrulina [reactivo A: 0.025% FeCl₃, 25% H₂SO₄, 20% H₃PO₄; reactivo B: 2-3 butanediona monoxima, antipirina, ácido acético (Upstate biotechnology)]. Se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.05% (PBS-T) y se bloquearon los sitios

inespecíficos con leche descremada al 3% en PBS por una hora a TA. Al término del bloqueo, se incubaron las membranas con 10 mL de anticuerpo anti-CM (anti-citrulina modificada) (Upstate biotechnology) dilución 1:10 000 por 1 hora a 37°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS-T y se agregaron 10 mL de anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (anti-IgG-HRP) (Upstate biotechnology) a una dilución 1:10 000 y se incubaron por 1 hora a 37°C. Se hizo un nuevo ciclo de tres lavados con PBS-T, un lavado con agua destilada y se adicionaron 3.0 mL de sustrato quimioluminiscente (Pierce) para HRP. Se expusieron las membranas durante 20 min a películas fotográficas (AGFA) y se revelaron en un equipo Kodak.

5.6 Reactividad de los sueros contra proteínas citrulinadas

Las proteínas citrulinadas fueron separadas mediante SDS-PAGE al 10% como se mencionó se colocaron 7.5 µg de proteínas por carril. Posteriormente se realizó EIT. La membrana de nitrocelulosa (invitrogen/0.2 µm) se bloqueó con leche al 3.0 % en PBS por 1 hora. Al término del bloqueo se incubó con los sueros de pacientes y sujetos sanos a una dilución 1:20 durante 1 hora a TA. Se realizaron 3 lavados con PBS-T y se incubó 1 hora a TA con anti-IgG humano conjugado con fosfatasa alcalina (FA) (SIGMA) a una dilución 1:5000. Posteriormente, se realizaron 2 lavados de 10 min c/u con PBS-T y un lavado con Tris 0.05M pH 8.8. Finalmente, se adicionó el sustrato para FA (Fast-red 2.0 mg/mL, α-Naftol 1.0 mg/mL en Tris 0.05 M pH 8.8) y se incubó con agitación hasta observar las bandas.

5.7 Purificación de las proteínas citrulinadas

Las proteínas citrulinadas fueron separadas en SDS-PAGE y las bandas de interés fueron cortadas, colocadas en membranas de diálisis (SIGMA) con amortiguador de electroforesis (3.0 % Tris-base, 1.4 % glicina, 1.0 % SDS) y dializadas durante 12 horas a 4°C. Posteriormente, se colocaron las membranas en una cámara MINI-SUB CELL GT (BIO-RAD) y se electroeluyeron durante una

hora a 100 Volts. Se transfirió el líquido a otra membrana y se dializó contra agua bidestilada por 24 horas a 4° C. Se concentraron las proteínas en columnas de Amicon Ultra 30k (Millipore) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se colocó el volumen obtenido de la diálisis dentro de una columna y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min a 4°C. Se recuperó el volumen restante y se desaló con columnas de desalado (Pierce) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se cortó la parte inferior de la columna y se colocó en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL. Se centrifugó a 12 000 rpm por 2 minutos para eliminar el líquido contenido en la columna. Se colocaron 120 µL de la muestra en el centro de la columna y se centrifugó a 14 000 rpm por 2 min a 4° C. Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

5.8 Separación de las proteínas en electroforesis en dos dimensiones (E-2D)

Las muestras previamente desaladas se diluyeron en amortiguador de rehidratación ReadyPrep 2-D (BIO-RAD) hasta un volumen final de 125 µL para tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) Ready strip (BIO-RAD) de 7 cm. Se colocaron las muestras en los contenedores para rehidratación (Disposable Rehydration/Equilibration Tray, BIO-RAD) e inmediatamente después se colocaron las tiras sobre la muestra distribuida a lo largo del carril, con la parte del gel hacia abajo. Se cubrieron con aceite mineral y se dejaron rehidratar por 12 horas a TA.

Posteriormente, para llevar a cabo el isoelectroenfoco (IEF), las tiras se transfirieron a los contenedores específicos (Focusing Tray/BIO-RAD) y en cada extremo del electrodo se colocó un papel filtro (Electrodo Wicks/BIO-RAD) previamente humedecido con agua bidestilada. Se colocaron las tiras con la parte de gel hacia abajo y con la marca (+) del lado del ánodo, se cubrieron con aceite mineral y se eliminaron las burbujas con ayuda de unas pinzas. Finalmente, se colocó el contenedor tapado en el equipo para IEF PROTEAN IEF Cell (BIO-

RAD). El IEF se llevó a cabo con el programa establecido del equipo: LINEAR, que consta de 15 min 250 volts, 2 horas 4000 volts a 20° C).

Una vez terminado el IEF las tiras fueron equilibradas con amortiguador de equilibrio I que contiene DTT (BIO-RAD) por 10 minutos y posteriormente colocadas en la solución de equilibrio II que contiene Iodoacetamida (BIO-RAD) para asegurar que las cisteínas se encontraran reducidas y alquiladas, con lo que se minimiza el fondo del corrimiento vertical que pudiera ser visible después de la tinción de los geles.

Posteriormente se lavaron las tiras con amortiguador de electroforesis y se colocaron sobre gel preparativo continuo de poliacrilamida al 10 %. Se colocaron 30 µL de amortiguador de muestra (1.87 M de Tris-HCl pH 8.8, glicerol 10%, SDS 10%) sobre la tira y se selló con agarosa al 1.5 %. Finalmente se realizó el corrimiento electroforético en una cámara Mini-protean cell II (BIO-RAD) a 80 volts durante 2 horas.

5.9 Tinción con plata

Una vez terminada la electroforesis, se colocaron los geles de poliacrilamida en una solución de ácido tricloroacético (SIGMA) al 20% (p/v) y se agitaron por una hora. Posteriormente se realizaron dos lavados de 30 minutos cada uno con etanol-ácido acético (4:1; SIGMA) y dos lavados de 20 min c/u con agua bidestilada. Al termino de los lavados se incubaron los geles en glutaraldehído al 10% (SIGMA) por 30 minutos y nuevamente se realizaron tres lavados pero en éste caso con agua bidestilada durante 30 minutos cada uno. Se colocaron los geles en 25 mL de una solución de plata [5.25 mL de NaOH 0.36% (J.T. Baker), 350 µL de NH₄OH al 37% (SIGMA), 1 mL de solución de AgNO₃ al 20% (Allied chemical) en agua bidestilada, esta última se añadió lentamente y con agitación. Una vez disuelta la plata se llevó a 25 mL con agua bidestilada] durante 15 minutos. Al termino de la incubación se realizaron 3 lavados de 5 min c/u con agua bidestilada. Finalmente, se colocaron los geles en

25 mL de la solución de desarrollo de tinción [125 µL de ácido cítrico al 1% (B.A), 13 µL de formaldehído al 36% (SIGMA), agua bidestilada] hasta observar bandas de color café. La reacción se detuvo cambiando la solución de desarrollo de color por una solución de etanol-ácido acético 4:1.

5.10 Tinción con azul de coomassie

Al termino de la electroforesis, se colocaron los geles de poliacrilamida en una solución al 20% de ácido tricloroacético por una hora con agitación a TA. Posteriormente, se colocaron en una solución de azul de coomassie [0.5% de azul de coomassie (Brilliant Blue R; SIGMA), 40% de metanol, 10% ácido acético] por una hora con agitación. Se realizaron 3 lavados con solución para desteñir (50% metanol, 7% ácido acético) de 2 horas cada uno. Finalmente, se realizaron 3 lavados con agua bidestilada.

5.11 Reactividad de los sueros contra proteínas citrulinadas en E-2D

Después de la separación de las proteínas en E-2D se hizo EIT. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 3% durante toda la noche a 4° C. Posteriormente, se incubaron durante 2 horas a 37° C con los sueros de pacientes o sujetos sanos a una dilución 1:20 en leche al 3% disuelta en PBS-T. Una vez terminado el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados de 10 min c/u con PBS-T. Posteriormente se incubaron las membranas con un anticuerpo anti-IgG-HRP humano (SIGMA) a una dilución 1:5000. Se realizaron 3 lavados con PBS-T y finalmente se incubaron con sustrato quimioluminiscente (Millipore) para peroxidasa. La membrana se expuso 20 min a una película fotográfica y se reveló en un equipo Kodak.

5.12 Espectrometría de masas

Las muestras fueron procesadas en la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. De manera breve, los puntos de proteínas fueron obtenidos a partir de un gel teñido con azul de coomassie y colocados en tubos de microcentrífuga con 50 µL de agua tridestilada. Las muestras fueron tratadas con DTT, alquiladas con iodoacetamida y digeridas con tripsina. Los péptidos trípticos fueron desalados y analizados en un sistema de cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de masas (CL/SM) tipo “*ion trap*” con fuente de ionización de *electrospray*. Las secuencias de los fragmentos de los péptidos obtenidos por CID (del inglés *collision induced dissociation*) fueron analizadas con diferentes bancos de datos (PEAKS, SEQUEST y MASCOT). Todas las secuencias fueron analizadas manualmente.

5.13 Determinación del punto isoelectrico (pI).

Tinción con *deep purple*

Las muestras y el marcador de pI (2.5µL de 2-D, SDS-PAGE Standards/BIO-RAD) fueron separados en E-2D y posteriormente tenidos con el reactivo fluorescente *Deep Purple* (Amersham) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Brevemente, los geles fueron incubados toda la noche con agitación a TA con 25 ml de una solución de ácido acético 7.5 % y etanol al 10%. Después de un lavado de 30 minutos con agua bidestilada, se incubaron con 50 mL de una solución 1:200 de *Deep purple* (0.250 ml de *deep purple* en 50 mL de una solución 200 mM de Na₂CO₃) con agitación, a TA y durante una hora en completa oscuridad. Posteriormente, se realizaron tres lavados con una solución de ácido acético al 7.5%. Las imágenes de los geles fueron registradas y analizadas en el equipo *Thyphon Scanner* utilizando el filtro para *Deep Purple*.

6. Resultados

6.1 Obtención de las proteínas nucleares y citoplásmicas de la línea celular HEp-2 y citrulinación *in vitro*

Se obtuvo la fracción nuclear y citoplásmica de la línea celular HEp-2 mediante tratamiento con amortiguadores hipotónicos y choque térmico, como se describe en materiales y métodos. La separación de las proteínas en SDS-PAGE y tinción de los geles con azul de coomassie mostró perfiles electroforéticos diferentes para cada una de las fracciones (figura 4). Las cantidades de proteínas obtenidas de la fracción nuclear fue menor con respecto a la cantidad de las proteínas de la fracción citoplásmica.

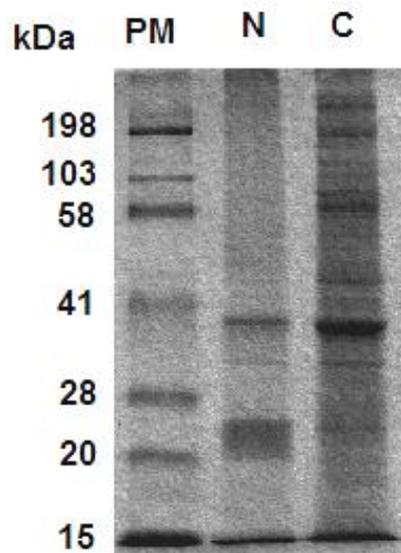


Figura 4. Corrimiento electroforético del lisado de células HEp-2. Tinción con azul de coomassie, carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: Proteínas nucleares y carril 3: Proteínas citoplásmicas

Posteriormente, se citrulinaron *in vitro* las fracciones protéicas con la enzima PAD2 de conejo. Para comprobar que se llevó a cabo la citrulinación, se realizó inmunopunto y EIT utilizando un anticuerpo anti-CM. En el caso del inmunopunto, se observó que si hubo citrulinación de las proteínas tanto del citoplasma como del núcleo. Sin embargo, como se puede observar en la figura 5, las proteínas citrulinadas en la fracción nuclear son muy pocas, por ello se decidió utilizar la fracción

citoplasmática para la identificación de antígenos citrulinados reconocidos por los anticuerpos presentes en los sueros de los pacientes con artritis temprana.



Figura 5. Detección de las proteínas citrulinadas mediante inmunopunto con anticuerpos anti-CM. + = albúmina sérica bovina citrulinada; - lisado de citoplasmas de células HEp-2 sin tratamiento; N = proteínas nucleares citrulinadas; y C= proteínas citoplasmáticas citrulinadas.

La figura 6 muestra el mapa proteómico de las proteínas citoplásmicas de células HEp-2 citrulinadas. Como se puede ver existe una gran cantidad de proteínas que fueron citrulinadas. La distribución a lo largo del gradiente de pH muestra que la mayoría de las proteínas tienen pI entre pH 3 y pH 7 aproximadamente. Esta distribución, es similar con la obtenida de proteínas nativas. Si bien, la citrulinación incrementa 1 Da por arginina citrulinada e incrementa el número de cargas positivas debido al cambio de un aminoácido neutro (arginina) a un residuo citrulinado con carga positiva, el patrón de distribución es prácticamente el mismo.

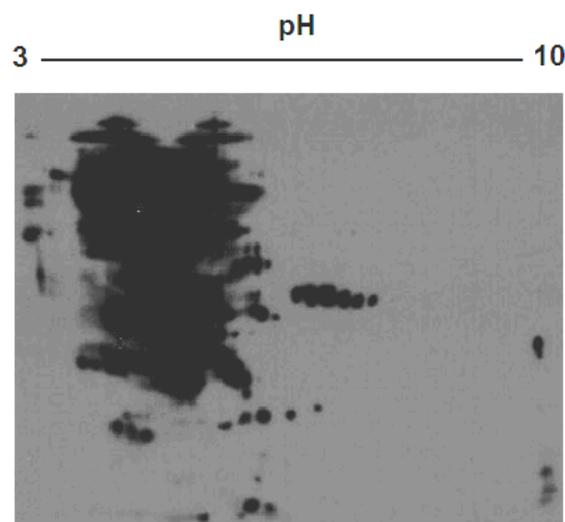


Figura 6. Mapa proteómico de proteínas citoplásmicas de células HEp-2 citrulinadas.

6.2 Reactividad contra proteínas citoplásmicas de células HEp-2 nativas y citrulinadas *in vitro*

Una vez obtenido el lisado citrulinado de células HEp-2 se realizó la separación de las proteínas mediante SDS-PAGE, tanto del lisado citrulinado como del nativo. Posteriormente, se llevó a cabo EIT utilizando 24 sueros de pacientes con artritis temprana y 12 sueros de sujetos sanos como control.

Como se observa en la figura 7, los sueros de los pacientes con artritis temprana reconocen un importante número de proteínas citrulinadas en comparación con el reconocimiento de proteínas nativas. Se observó el reconocimiento de una banda de alrededor de 48 kDa en 54% (13/24) de los pacientes, de éstos sólo tres (0.72%) reconocieron la proteína de 48 kDa tanto en su forma citrulinada como nativa. Ninguno de los sueros de los sujetos sanos reconoció la banda de 48 kDa. El 25% (6/24) de los pacientes reconoció una banda de aproximadamente 55 kDa sólo en la forma citrulinada (figura 7).

Otra proteína alrededor de 104 kDa fue reconocida por el 100% de los pacientes sólo en la forma nativa. Mientras que el 58.3% de los sujetos sanos reconocieron la misma proteína en su forma nativa y sólo 8.3% (1/12) de los sueros reconoció una banda de aproximadamente 58 kDa en su forma citrulinada (figura 8).

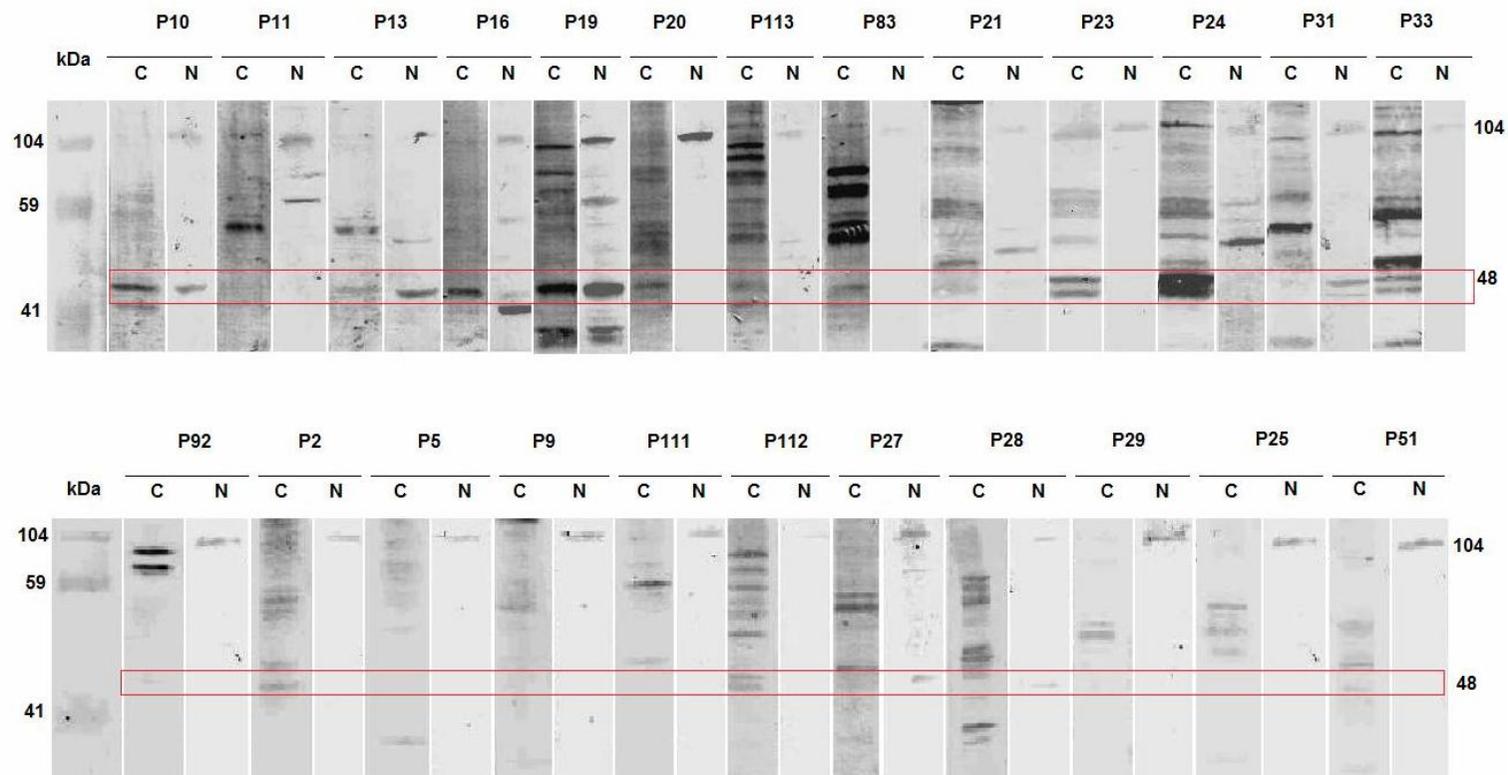


Figura 7A. Reactividad de los sueros de pacientes con artritis temprana contra proteínas citoplásmicas de células HEp-2 nativas y citrulinadas *in vitro*. En el rectángulo rojo se muestra la proteína de 48 kDa reconocida por el 54% de los sueros de los pacientes. Abreviaturas: P#=paciente; C= proteínas citrulinadas; N=proteínas nativa

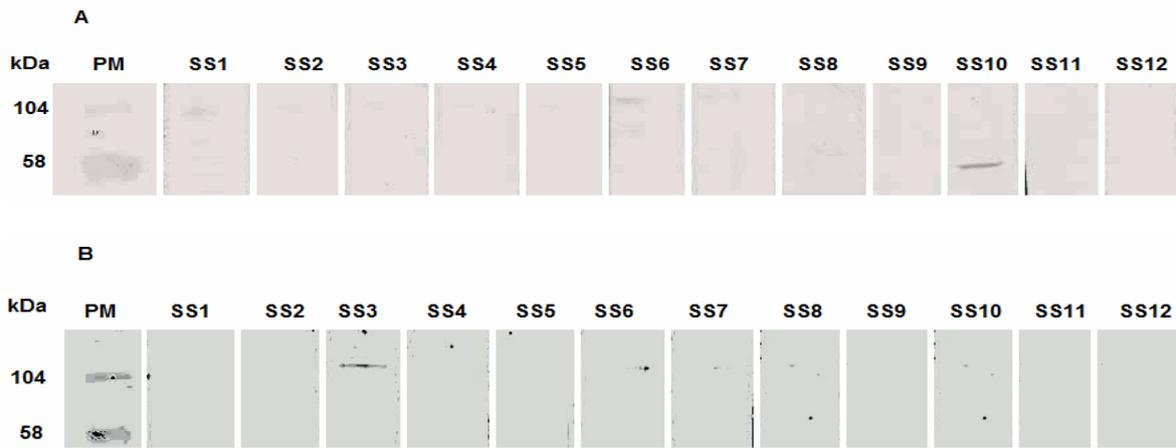


Figura 7B. Reactividad de los sueros de sujetos sanos contra proteínas citoplásmicas de células HEp-2 nativas y citrulinadas *in vitro*. A) proteínas nativas. B) Proteínas citrulinadas. SS#= sujeto sano.

6.3 Reactividad de muestras seriadas de una paciente con artritis temprana.

Para determinar el reconocimiento de las proteínas citrulinadas por el suero de los pacientes a lo largo del tiempo, se realizó EIT del lisado citoplásmico y se determinó la reactividad contra proteínas citrulinadas con el suero de muestras seriadas de una paciente. Las muestras fueron tomadas con diferencia de tres meses aproximadamente. Como se puede observar en la figura 8, todas las muestras seriadas reconocen la proteína de 48 kDa y por la intensidad de las bandas observadas se puede establecer que la reactividad hacia la proteína de 48 kDa está bien definida a lo largo de la evolución de la AR. Por otra parte, el reconocimiento hacia otras proteínas citrulinadas varía entre las muestras seriadas de la misma paciente. En el caso de la muestra 6, el reconocimiento de las bandas diferentes a la de 48 kDa disminuye en comparación a las muestras de la 1 a la 4. Sin embargo, la muestra 7 también muestra reconocimiento de otras bandas diferentes a 48 kDa.

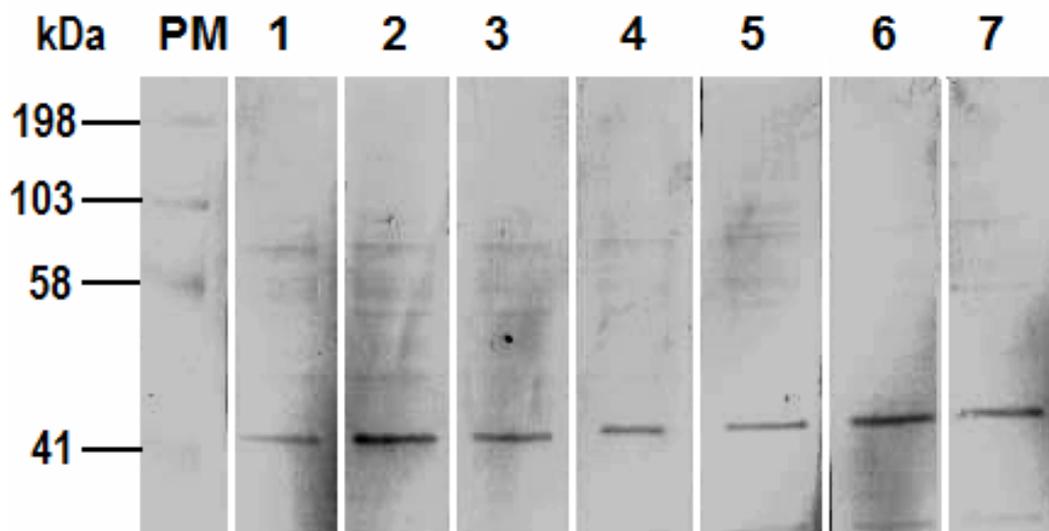


Figura 8. Reactividad de muestras seriadas de una paciente con artritis temprana contra proteínas citoplasmáticas de células HEp-2 citrulinadas *in vitro*. Las muestras fueron tomadas con diferencia de tres meses. Carriles: PM = marcador de peso molecular; **1)** 3 meses; **2)** 6 meses; **3)** 9 meses; **4)** 12 meses; **5)** 15 meses; **6)** 18 meses; **7)** 21 meses.

6.4 Purificación de las proteínas citrulinadas reconocidas por los sueros de los pacientes con artritis temprana

Se purificaron y concentraron las proteínas que se localizan entre los marcadores de peso molecular de 103 y 58 kDa y las que se localizan por arriba del marcador de 41 kDa pero debajo de 58 kDa, como se describe en la metodología. Que como se mostró son las regiones en donde se localizan las proteínas de 72, 94 y 48 kDa respectivamente que son reconocidas por los sueros de los pacientes con AR. Posteriormente, se verificó que las fracciones purificadas correspondieran a los pesos moleculares esperados, mediante la separación en SDS-PAGE y tinción con plata. El carril 1 de la figura 9 muestra el patrón de bandas de las proteínas localizadas entre 104 y 58 kDa. En el carril 2 se muestra el patrón de bandas que corresponden a las proteínas localizadas por arriba de 41 kDa pero menores de 58 kDa.

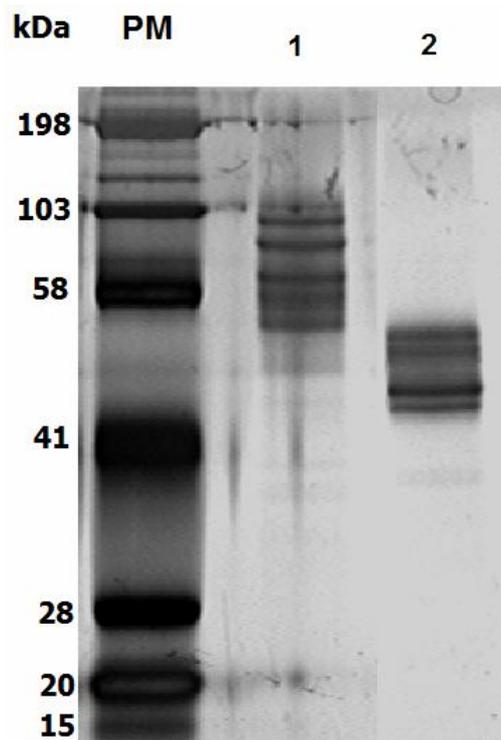


Figura 9. Tinción con plata de las proteínas purificadas. Carriles: PM = marcador de peso molecular; **1** = proteínas citrulinadas localizadas entre 104 y 58 kDa; **2** = proteínas citrulinadas localizadas arriba entre 41 y 58 kDa

6.5 Reactividad de los sueros de pacientes con artritis temprana contra proteínas del citoplasma purificadas y citrulinadas *in vitro*

Se verificó que se concentraron las proteínas y que el tratamiento utilizado para purificar no afectó su reconocimiento mediante EIT. La figura 10 muestra en el carril 1 las proteínas purificadas y en el carril 2 las proteínas del lisado completo. Se colocaron 3 μg de proteína/carril y se identificaron utilizando dos sueros. Uno que reconoce dos bandas localizadas entre los pesos moleculares 103 y 58 kDa, suero del paciente 83 (P83) y otro que reconoce una banda próxima a los 48 kDa, paciente 10 (P10). En la figura 10A, se muestra la reactividad del suero P83 contra las proteínas purificadas y proteínas del lisado completo, como se puede ver, la intensidad de las bandas de las proteínas purificadas es mayor en comparación con la intensidad de las bandas de las proteínas en el lisado completo. La figura 10B muestra la reactividad del suero P10.

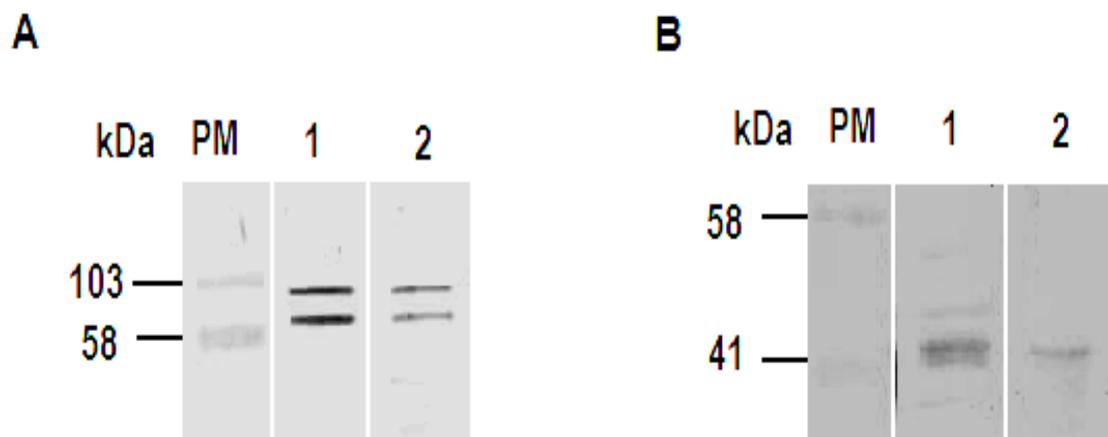


Figura 10. Reactividad de los sueros P83 y P10 de pacientes con artritis temprana contra proteínas citoplasmáticas citrulinadas. **A** Reactividad del suero P83; PM = marcador de peso molecular; carril 1 = proteínas citoplasmáticas purificadas y concentradas; carril 2 = lisado completo. **B** Reactividad del suero P10. Carril 1 = proteínas citoplasmáticas purificadas y concentradas; carril 2 = lisado completo

6.6 Separación de las proteínas reconocidas por la muestra P83

Se realizó la separación de las proteínas citrulinadas purificadas localizadas entre los pesos moleculares 103 y 58 kDa mediante E-2D. Se colocaron las proteínas en dos gels, uno se tiñó con plata y con el otro se realizó EIT con el suero P83. La figura 11A muestra el perfil por tinción con plata de las proteínas localizadas entre pesos 103 y 58 kDa. La figura 11B muestra la EIT en la que se utilizó el suero P83. Como se puede observar, existe reactividad contra tres proteínas localizadas entre los pesos 103 y 58 kDa, los cuales, corresponden por su localización a las bandas observadas en la E-1D entre las proteínas de 92 y 74 kDa.

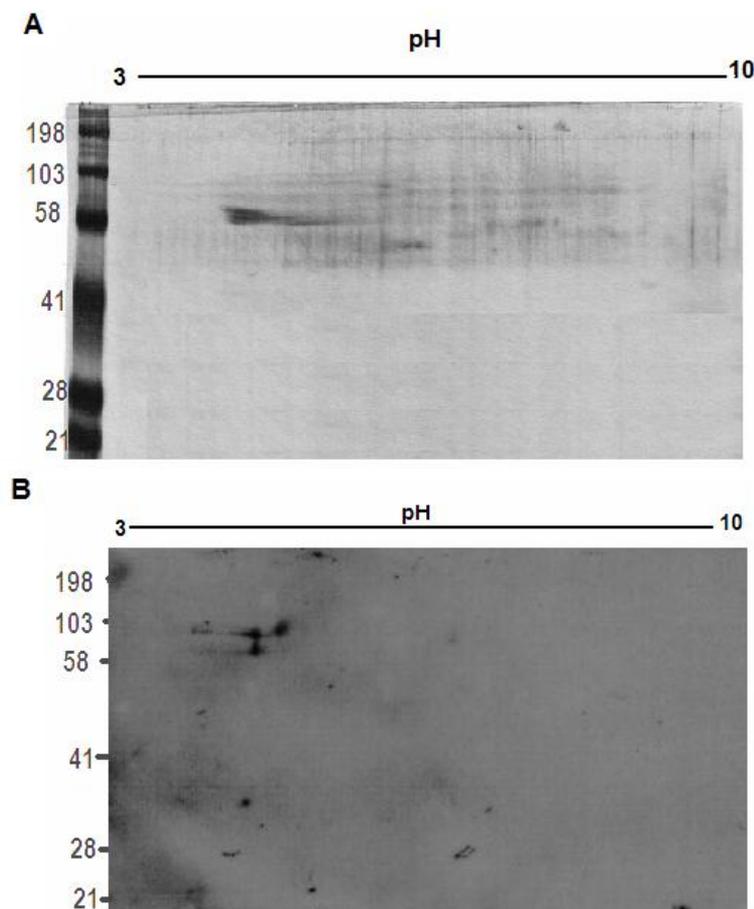


Figura 11. Mapa proteómico de las proteínas reconocidas por el suero P83. A Tinción con plata. **B** EIT con la muestra P83 revelada por quimioluminiscencia.

6.7 Separación de las proteínas reconocidas por la muestra p10

Como se hizo con el suero p83, se realizó la separación de las proteínas que se localizaron entre los pesos 58 y 41 kDa. La figura 12A muestra el perfil de tinción de las proteínas separadas mediante E-2D teñidas con plata. La figura 12B muestra la EIT de la muestra P10. Como se puede ver, existe reconocimiento de 6 proteínas localizadas entre los 41 y 58 kDa que de acuerdo a su localización corresponden a la banda de 48 kDa detectada en la E-1D.

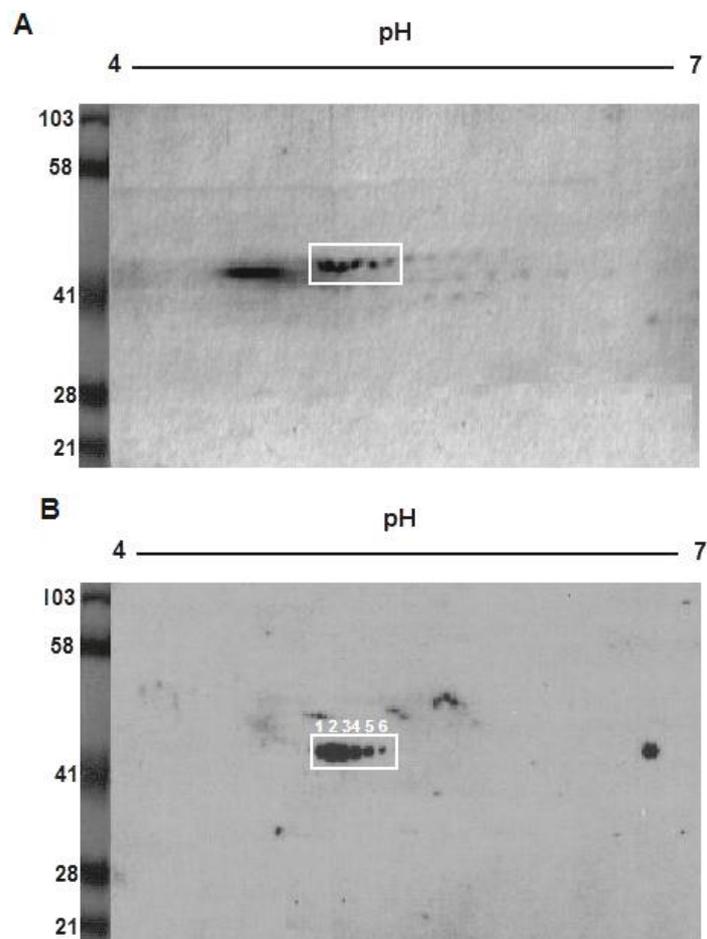


Figura 12. Mapa proteómico de las proteínas reconocidas por el suero P10. A. Tinción con plata **B.** EIT con la muestra P83 revelada por quimioluminiscencia.

6.8 Identificación de las proteínas reconocidas

Para la identificación de las proteínas reconocidas por las muestra P83 y P10, se corrieron en E-2D los lisados citoplásmicos de células HEp-2 y se purificaron aquellas proteínas que se localizan por arriba de los 41 kDa en los geles de E-2D. Posteriormente los geles se tiñeron con azul de Coomassie, se cortaron los puntos correspondientes a las proteínas 1-6 (figura 12B), las cuales son reconocidas por el suero de los pacientes P10. Las proteínas se secuenciaron mediante espectrometría de masas. Brevemente, las muestras se digirieron con tripsina y los fragmentos de los péptidos obtenidos por CID (Collision Induced Dissociation) se analizaron en diferentes bases de datos mediante los programas PEAKS, SEQUEST y MASCOT. Las secuencias de los péptidos analizados de las proteínas 2 a la 5 (figura 12B) mostraron 100% de homología con la enolasa- α (figura 13), la variación en su movilidad se debe a isoformas de la proteína. Las proteínas 1 y 6 no fueron secuenciadas debido a que su concentración es muy baja, sin embargo, por los datos obtenidos se puede inferir que son también isoformas de la enolasa- α .

```
1      MSILK IHARE IFDSR GNPTV EVDLF TSKGL FRAAV PSGAS TGIYE ALELR
51     DNDKT RYMGK GVSKA VEHIN KTIAP ALVSK KLNVT EQEKI DKLMI EMDGT
101    ENKSK FGANA ILGVS LAVCK AGAVE KGVPL YRHIA DLAGN SEVIL PVPAF
151    NIVING GSHAG NKLAM QEFMI LPVGA ANFRE AMRIG AEVYH NLKNV IKEKY
201    GKDAT NVGDE GGFAP NILEN KEGLE LLKTA IGKAG YTDKV VIGMD VAASE
251    FFRSG KYDLD FKSPD DPSRY ISPDQ LADLY KSFIK DYPVV SIEDP FDQDD
301    WGAWQ KFTAS AGIQV VGDDL TVTNP KRIAK AVNEK SCNCL LLKVN QIGSV
351    TESLQ ACKLA QANGW GVMVS HRSGE TEDTF IADLV VGLCT GQIKT GAPCR
401    SERLA KYNQL LRIEE ELGSK AKFAG RNFRN PLAK
```

Figura 13. Secuencia de aminoácidos de la enolasa- α .

6.9 Citrulinación de las isoformas de la enolasa- α

Las cuatro isoformas de la enolasa- α presentan diferencias en el patrón de citrulinación. La tabla 3 muestra la localización y secuencia de los péptidos trípticos, así como, la posición de los residuos de citrulina. Como se puede ver, la proteína 2 contiene cuatro sitios de citrulinación localizados en las posiciones 9, 274, 412 y 429; la proteína 3 en 182, 412, 426 y 429; la proteína 4 en 15, 253, 269 y 412 y la proteína 5 en 269 y 412. Todas las proteínas coinciden en la citrulinación en la posición 412. Las proteínas 2 y 3 tienen citrulinada la posición 429 y las proteínas 4 y 5 la posición 269.

Punto en el mapa proteómico	Localización del péptido	Secuencia de péptidos trípticos	Citrulinación
2	7-28	IHA(Citrulinación_R)EIFDSRGNPTVEVDLFTSK	R9
	263-281	SPDDPS(Citrulinación_R)YISPDQLADLYK	R274
	407-420	YNQLL(Citrulinación_R)IEEELGSK	R412
	423-434	FAGRNF(Citrulinación_R)NPLAK	R429
3	179-192	EAM(Citrulinación_R)IGAEVYHNLK	R182
	407-420	YNQLL(Citrulinación_R)IEEELGSK	R412
	423-434	FAG(Citrulinación_R)NF(Citrulinación_R)NPLAK	R426, R29
4	9-28	FDS(Citrulinación_R)GNPTVEVDLFTSK	R15
	240-256	VVIGMDVAASEFF(Citrulinación_R)SGK	R253
	262-281	SPDDPS(Citrulinación_R)YISPDQLADLY	R269
	407-420	YNQIL(Citrulinación_R)IEEELGSK	R412
5	262-281	SPDDPS(Citrulinación_R)YISPDQLADLYK	R269
	407-420	YNQLL(Citrulinación_R)IEEELGSK	R412

Tabla 3 Ubicación de los residuos de citrulina en las isoformas de la enolasa- α . R=arginina.

6.10 Determinación del pI

Para determinar el pI de las proteínas secuenciadas (puntos 2 al 5 del mapa proteómico, figura 14), se corrió un gel en E-2D, el cual se tiñó con deep purple y posteriormente se analizó con el software Image Master 2D Platinum 6.0 (GE Healthcare). El pI para la proteína 2 fue de 5.08; para la 3 de 5.14; para la 4 de 5.2 y para la 4 de 5.26 (tabla 4). El peso molecular calculado es de 48 kDa para las cuatro isoformas (tabla 4). El análisis de los índices de expresión dados por la relación volumen/área, muestra que los niveles de expresión para las tres isoformas de la enolasa- α secuenciadas son: la proteína 2 se encuentra en mayor proporción que la 3, la 3 se encuentra en mayor proporción que la 4 y la 4 se encuentra en mayor proporción que la 5 (figura 15).

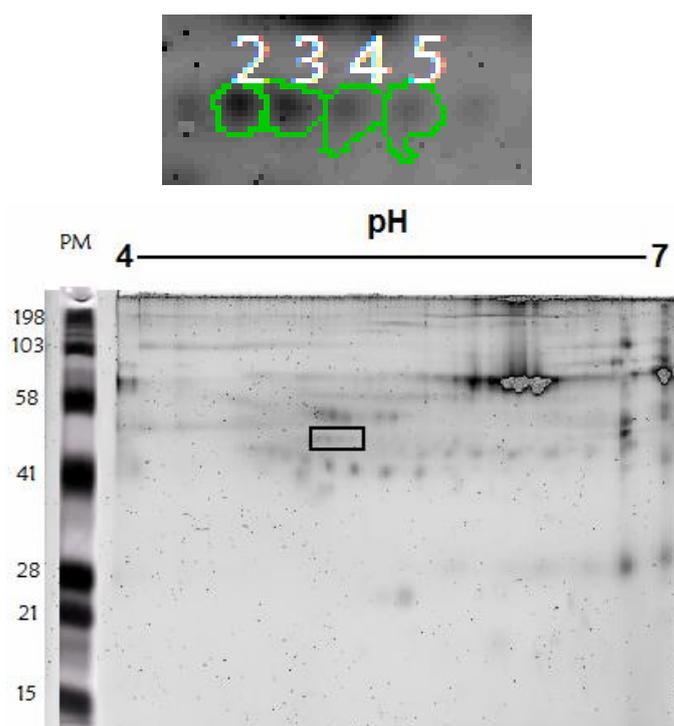


Figura 14. Mapa proteómico de las proteínas secuenciadas y teñidas con deep purple

Punto	pI	PM (Da)	Índice de expresión
2	5.08	48841	3500
3	5.14	48841	3100
4	5.2	48671	1800
5	5.26	48671	1400

Tabla 4. Determinación del pI de las proteínas secuenciadas

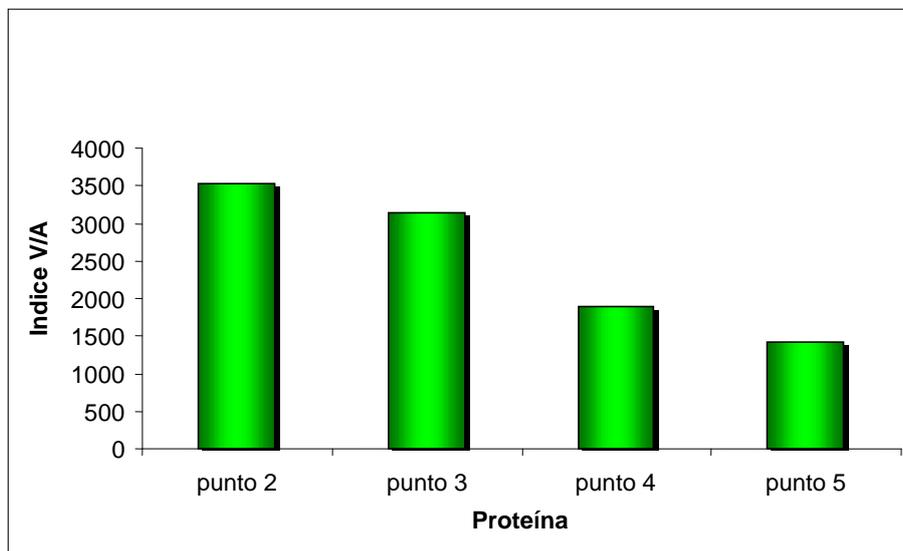


Figura 15. Índices de expresión de las cuatro isoformas de la enolasa- α .

6.11 Homología con otras proteínas citrulinadas

Para determinar la homología de las isoformas de la enolasa- α que tienen residuos de citrulina, con otros antígenos citrulinados reportados, se compararon dichas secuencias con proteínas que son blancos citrulinados de anticuerpos presentes en pacientes con artritis temprana. Las proteínas comparadas fueron: la cadena alfa de colágeno, vimentina y péptidos sintéticos de fibrina. Se identificó homología con diferentes péptidos que contienen arginina citrulinada (tabla 5). En el caso de la comparación de la enolasa- α con la cadena alfa del colágeno se identificaron dos péptidos que tienen homología en algunos aminoácidos que se encuentran próximos al sitio de citrulinación: **XXXAXXXRSXK** y **XSXXXXTVXVD**. En la comparación con vimentina se encontraron también dos péptidos que comparten homología con algunos residuos de aminoácidos de la enolasa- α : **EXXXRXNXXVEXX** y **XXIXRXXEXLQ**. Por su parte, la comparación entre las isoformas de la enolasa- α y péptidos sintéticos de la fibrina mostró homología en algunos residuos de aminoácidos de dos péptidos que contienen residuos de citrulina: **XXXRGXXTXEX** y **XXIXTS** (R=arginina citrulinada).

Péptido	Localización del péptido	Secuencia del péptido
Colágeno cadena alfa	1212-1222	N I P A K N W Y R S S K
Enolasa-α (R253)	240-256	D V A A S E F F R S G K
Colágeno cadena alfa	1305-1316	N S R F T Y T V L V D
Enolasa-α (R9)	7-28	D S R G N P T V E V D
Vimentina	95-109	E F K N T R T N E K V E L Q
Enolasa-α (R15)	9-28	E I F D S R G N P T V E V D
Vimentina	180-190	E D I M R L R E K L Q
Enolasa-α (R412)	407-420	N Q I L R I E E E L G
Péptido sintético de fibrina	588-602	S Y N R G D S T F E S
Enolasa-α (R15)	9-28	F T S R G N P T V E D
Péptido sintético de fibrina	621-635	V R G I H T S
Enolasa-α (R9)	7-28	A R E I F T S

Tabla. 5 Homología de los péptidos citrulinados de la enolasa- α con fragmentos de la cadena alfa de colágeno, vimentina y péptidos sintéticos de fibrina. **R=arginina citrulinada.**

7. Discusión

En el presente trabajo, realizamos el análisis de una proteína de aproximadamente 48 kDa, proveniente de la fracción citoplasmática citrulinada *in vitro* de la línea celular HEp-2. Dicha proteína fue reconocida por el suero de 14 de 24 pacientes con artritis temprana (56.0 %). De estas muestras de suero sólo 3 de 24 (0.72%) reconocen tanto la forma citrulinada como la nativa. Ninguno de los doce sueros de sujetos sanos estudiados (0 %) reconoció la proteína de 48 kDa en su forma nativa o citrulinada. Además, observamos que la banda de 48 kDa reconocida por los sueros de los pacientes corresponde a un grupo de 6 proteínas de puntos isoeléctricos entre 5.0 y 5.3.

En otros trabajos, han encontrado proteínas citrulinadas con alta especificidad para AR, entre las que se encuentran las colágenas tipo I y II (Cook y cols. 2004, Suzuki y cols. 2005.), fibrinógeno (Masson y cols. 2001) y la vimentina (Vossenaar y cols. 2004, Tilleman y cols. 2008).

Por su parte, Matsuo y cols. en el 2006 analizaron el perfil proteómico de tejido sinovial de un paciente con AR y detectaron 51 proteínas citrulinadas, de las cuales 30 (58.8%) fueron antigénicas. 13 de las 30 proteínas fueron identificadas como derivados del fibrinógeno, asporina y la subunidad α de la proteína de unión a actina-F (CapZ α -1). Además, detectaron anticuerpos contra CapZ α -1 en 16 de 30 (53.3%) de los sueros de pacientes con AR, en 2 de 28 (7.1 %) con osteoartritis y en 2 de 31 (6.5%) sujetos sanos (Matsuo y cols. 2006).

Posteriormente, mediante CL/SM analizamos cuatro de las seis proteínas que componen el grupo de proteínas reconocidas por los anticuerpos. El análisis mostró que corresponden a cuatro isoformas de la enolasa- α . Nuestros resultados confirmaron los reportes previos, en los que se ha reportado que los anticuerpos anti-enolasa- α están presentes en el suero de pacientes con enfermedades autoinmunes (Pancholi 2001, Pratesi y cols. 2000, Vermeulen y cols. 2008, Lee y cols. 2003, Chun y cols. 2008).

La enolasa- α es una enzima glicolítica, que tiene actividad multifuncional, es un receptor de plasminógeno que se localiza sobre la superficie de una amplia variedad de células hematopoiéticas, epiteliales y endoteliales, lo que sugiere un papel importante en el sistema fibrinolítico intravascular y pericelular (Pancholi, 2001). Su papel en padecimientos autoinmunes localizados y generalizados está siendo estudiado. Pratesi analizó la presencia y especificidad de anticuerpos anti-enolasa- α en varias enfermedades autoinmunes. Utilizando enolasa- α purificada de hígado humano y mediante inmunopunto, detectó la presencia de anticuerpos anti-enolasa- α en 9 de 33 (27%) pacientes con LEG , en 6 de 29 (31.5 %) pacientes con crioglobulinemia mixta (CM) y nefritis, en 0 de 15 con CM sin daño renal, en 6 de 20 (30%) pacientes con esclerosis sistémica (ES), en 2 de 35 (6%) pacientes con AR y solo en 2 de 32 (6%) sujetos sanos (Pratesi y cols. 2000). En este estudio muestran que los anticuerpos anti-enolasa- α pueden ser detectados en un porcentaje bajo en enfermedades autoinmunes y no evalúan si tienen algún valor diagnóstico. Además, al parecer en AR no existe diferencia en comparación con los sujetos sanos.

Por otro lado, Vermeulen en su estudio, evaluó la prevalencia y el valor diagnóstico de los anticuerpos anti-enolasa- α en la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y otros padecimientos asociados, observando que los anticuerpos anti-enolasa- α están presentes en una proporción significativa en los pacientes con EII, en pacientes con diversos padecimientos inflamatorios autoinmunes y en controles con enfermedades gastrointestinales en donde no está presente la EII (Vermeulen y cols. 2008). Por otro lado, Lee detectó mediante ELISA anticuerpos anti-enolasa- α de isotipo IgM en 18 de 40 sueros (45%) de pacientes con enfermedad de Behcet (Lee y cols. 2003). Además, se ha estudiado la presencia de anticuerpos anti-enolasa- α y su importancia como marcador serológico en la enfermedad de Kawasaki (Chun y cols. 2008). Por otro lado, la presencia de anticuerpos anti-enolasa- α no se asoció con el desarrollo de retinopatía en pacientes con EM (Forooghian y cols. 2001).

En lo que se refiere a trabajos en los que estudiaron pacientes con AR, Salout detectó, mediante un análisis proteómico, reactividad contra enolasa- α en el 25% de sueros de pacientes con AR. La reactividad detectada fue contra tres isoformas de la enolasa- α proveniente de células MC-F12 (línea celular epitelial). Además, observó que la presencia de anticuerpos anti-enolasa- α puede ser un factor predictivo de la progresión radiológica en AR (Saulot y cols. 2002). Este trabajo a diferencia del reporte de Pratesi, encuentra que sí existe un porcentaje de pacientes con AR que reconoce a la enolasa- α .

Por nuestra parte, observamos que el reconocimiento de la enolasa- α por los anticuerpos presentes en los sueros de pacientes con artritis temprana es específico de la forma citrulinada, como previamente se había reportado por Kinloch y colaboradores, quienes mostraron que 24 de 52 (46%) de los sueros de los pacientes con AR estudiados tiene anticuerpos anti-enolasa- α citrulinada (Kinloch y cols. 2005).

Además, identificamos cuatro isoformas de la enolasa- α , las cuales presentan diferencias en el patrón de citrulinación. Lo cual contrasta con el trabajo de Kinloch, quien identificó solo una isoforma de la enolasa- α con nueve sitios citrulinados (Kinloch y cols. 2005). Los sitios de citrulinación fueron los mismos que identificamos en las cuatro isoformas de la enolasa- α . Sin embargo, un punto importante que se debe destacar es que como ya se había mencionado, cada isoforma tiene un patrón diferente en por lo menos un sitio de citrulinación. Además, las cuatro isoformas tienen un punto de citrulinación común, el cual se localiza en la arginina 412. La diferencia con el estudio de Kinloch, pudiera deberse al tipo de células utilizadas. En su estudio Kinloch utilizó células HL-60 y en nuestro estudio empleamos la línea celular humana HEp-2.

Para identificar secuencias comunes que contienen residuos de citrulina, comparamos los péptidos trípticos de las isoformas de la enolasa- α que contienen residuos de citrulina con secuencias de la cadena α del colágeno, vimentina y

péptidos sintéticos de la fibrina (tabla 6), las cuales se han identificado como los principales blancos de los anticuerpos contra proteínas citrulinadas presentes en el suero de los pacientes con AR (Cook y cols. 2004, Suzuki y cols. 2005, Vossenaar y cols. 2004, Tilleman y cols. 2008, Masson y cols. 2001). En el estudio comparativo con la secuencia de la cadena- α del colágeno (Cook y cols. 2004), identificamos dos péptidos que presentan homología en algunos aminoácidos que flanquean el sitio de citrulinación, en tanto que, la comparación con la secuencia de la vimentina (Vossenaar y cols. 2004) observamos homología con aminoácidos ubicados en dos péptidos que contienen residuos de citrulina, uno de ellos contiene el sitio de citrulinación en la posición 412 (XXIXRXXEXLX), que como mencionamos anteriormente, es un sitio común de citrulinación de las cuatro isoformas identificadas de la enolasa- α . Lo anterior sugiere que el epítopo que contiene la posición 412 citrulinada, es uno de los epítopos importantes para el reconocimiento de proteínas citrulinadas por los APC.

Además, identificamos dos péptidos de la enolasa- α que comparten homología con algunos residuos de aminoácidos de los péptidos sintéticos de la fibrina reportados por Sebbag. Uno compuesto por los aminoácidos 588-602_{cit591} y otro por los aminoácidos 621-635_{cit 621, 627, 629} (Sebbag y cols. 2006), de los cuales el segundo mostró una reactividad alta en 50% de los sueros que analizaron. Lo anterior sugiere que la secuencia XRXIXTS presente en el péptido 7-28_{cit 9} de la enolasa- α y en el péptido 621-635_{cit621,627,629} (Sebbag y cols. 2006) de la fibrina puede ser otro de los epítopos importantes para el reconocimiento de las proteínas citrulinadas. Este resultado concuerda con el reporte reciente de Kinloch donde determinó el péptido inmunodominante de la enolasa- α reconocido por el suero de pacientes con AR denominado CEP-1, el cual tiene una sensibilidad alrededor de 50% (Kinloch y cols 2008). La secuencia del péptido CEP-1 (Kinloch y cols 2008) _{cit} corresponde a uno de los péptidos trípticos citrulinados identificados por nosotros (7-28_{cit 9}) que además comparte homología con algunos aminoácidos de un péptido sintético de la fibrina (621-635_{cit 621, 627, 629}. Sebbag y cols. 2006).

El análisis de las características de los aminoácidos de dos péptidos de la enolasa- α , que flanquean a la citrulina y que comparten homología con un péptido de la vimentina y con un péptido sintético derivado de la fibrina mostró que los aminoácidos que comparten homología son principalmente de naturaleza no polar. Lo cual, sugiere que las interacciones hidrofóbicas participan de manera importante en el reconocimiento de éstos epítopes.

Los resultados obtenidos de la comparación de los péptidos de la enolasa- α con otras proteínas muestran que sí existe homología en algunos aminoácidos que flanquean la posición de la arginina citrulinada lo cual, puede explicar de alguna manera la especificidad parecida entre los anticuerpos contra la forma citrulinada de diferentes proteínas como son la enolasa- α , la colágena, la vimentina y la fibrina. Sin embargo, para poder establecer la participación de dichos aminoácidos en el reconocimiento se requieren estudios más detallados.

8. Conclusiones

- Identificamos a la enolasa- α citrulinada como uno de los antígenos dominantes reconocidos por los sueros de pacientes con artritis temprana.
- Determinamos la reactividad contra cuatro isoformas de la enolasa- α citrulinadas por el suero de pacientes con artritis temprana.
- Las cuatro isoformas de la enolasa- α presentan diferencias en el patrón de citrulinación.
- Identificamos homología entre residuos de aminoácidos de la enolasa- α que incluyen a la citrulina con péptidos de la cadena α del colágeno, vimentina y péptidos sintéticos de la fibrina.
- El estudio de los epítopes de las proteínas citrulinadas presentes en el sitio de la inflamación permitirá entender mejor la patogénesis de la enfermedad.

9. Bibliografía

Akyyama, K., Sakurai, Y., Asou, H. & Shensu, T. **Localization of peptidylarginine deiminase type II in a stage-specific immature oligodendrocyte from rat cerebral hemisphere.** *Neurosci Lett.* 1999; 241: 53-5.

Alarcón, GS. **Epidemiología de las enfermedades reumáticas.** En: Lience E, ed. *Patología Reumatológica básica.* Barcelona, Idepsa, 1981; 1-9.

Arita, K., Hashimoto, H., Shimizu, T., Nakashima, K., Yamada, M., & Sato, M. **Structural basis for Ca²⁺- induced activation of human PAD4.** *Nat Struct Mol Biol.* 2000; 11: 777-83.

Arnet, FC., Edworthy, SM. & Bloch, DA. **The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of Rheumatoid Arthritis.** *Arthritis & Rheum.* 1988; 31:315-24.

Asaga, K., Yamada, M. & Shensu, T. **Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 243: 641-46.

Barton, A., Bowes, J., Eyre, S., Spreckley, K., Hinks, A., & John, S. **A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in Japanese population is not associated in a United Kingdom population.** *Arthritis & Rheum.* 2004; 50: 1117-21.

Benedek, TG. & Rodnan, GP. **A brief history of the rheumatic diseases.** *Bull Rheum Dis.* 1982; 32: 93-102.

Beniac, JM., Rangaraj, G., Koshy, KM., Ackerley, C., Wood, DD. & Harauz, G. **Highly deiminated isoform of myelin basic protein from multiple sclerosis brain causes fragmentation of lipid vesicles.** *J Neurosci Res.* 2000; 129: 80-95.

Boggs, JM., Rangaraj, G., Koshy, KM., Ackerley, C., Wood, DD. & Moscarello, MA. **Highly deiminated isoform of myelin basic protein from multiple sclerosis brain causes fragmentation of lipid vesicles.** *J Neurosci Res.* 1999; 57: 529-35.

Boire, G., Cossette, P., Brum-Fernández, A., Liang, P., Niyonsenga, T., Zhou, Z., & Carrier, N. **Anti-Sa antibodies and antibodies against cyclic citrullinated peptide are not equivalent as predictors of severe outcomes in patients with recent-onset polyarthritis.** *Arthritis Res Ther.* 2005; 7: 592-603.

Burkhardt, H., Sehnert, B., Bockermann, R., Engstrom, A., Kalden, J. & Holmdahl, I. **Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis.** *Eur J Immunol.* 2005; 35: 1643-52.

Caponi, L., Petit-Teixeira, E., Sebbag, M., Bongiorno, F., Moscato, S. & Pratesi, F. **A family based study shows no association between rheumatoid arthritis and the PADI4 gene in a white French population.** *Ann Rheum Dis.* 2005; 64: 587-93.

Chang, X., Yamada, R., Suzuki, A., Sawada, T., Yoshino, S. & Tokuhira, S. **Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2005; 44: 40-50.

Chavanas, S., Mechin, M., Takahara, H., Kawada, A., Nachat, R. & Serre, G. **Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase 4 gene clusters reveals highly conserved non coding-segments and a new human gene PADI6.** *Gene.* 2004; 330: 19-27.

Chun, JK., Lee TJ., Choin, KM., Lee, KH. & Kim, DS. **Elevated anti-alpha-enolase antibody in Kawasaki disease.** *Scand J Rheumatol.* 2008; 37: 48-52.

Cook, A., Gray, R., Ramshaw, J., Mackay, I. & Rowley, M. **Antibodies against the CB10 fragment of type II in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther.* 2004; 6: 477-83.

Deighton, CM., & Walker, DJ. **The familial nature of rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis.* 1991; 50: 62-5.

Forooghian, F., Adamus, G., Sproule, M., Westall, C. & O'Connor, P. **Enolase autoantibodies and retinal function in multiple sclerosis patients.** *Cell mol Life Sci.* 2001; 58: 902-20.

Fraser, K. The Waaler-Rose Test: **Anatomy of the eponym.** *Sem Arthritis Rheum.* 1998; 18: 61-71.

Gaalen, FA., Linn-Rasker, SP., Venrooij, WJ. Jong, BA., & Breedveld, FC. **Autoantibodies to cyclic citrullinated predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis.** *Arthritis & Rheum.* 2004; 50: 709-715.

Girbal-Neuhuser, E., Durieux, JJ., Arnaud, M., Dalbon, P., Sebag, M. & Vicent, C. **The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilagrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filagrin by deimination of arginine residues.** *J Immunol* 1999; 162: 585-94.

György, B., Tóth, E., Tarcsa, E., Falus, A., & Buzás, E. **Citrullination: A posttranslational modification in health and disease.** *Int J Biochem & Cell Biol.* 2006; 38: 1662-77

Harding, CR., & Scott, IR. **Histidine-rich proteins (filagrins): Structural and functional heterogeneity during epidermal differentiation.** *J Mol Biol.* 1983; 170: 651-73.

Harris, ML., Darrah, E., Lam, GK., Bartlett, SJ., Giles, JT., Grant, AV., Gao, P., Scott WW., El-Gabalawy, H., Casciola-Rosen, L., Barnes, KC., Bathon, JM. & Rosen, A. **Association of autoimmunity to peptidyl arginine deiminase type 4 with genotype and disease severity in rheumatoid arthritis.** *Arthritis & Rheum.* 2008; 58: 1958-67.

Hochberg, MC. & Spector, TD. **Epidemiology of Rheumatoid Arthritis: Update.** *Epidem Rheum.* 1990; 12:147-252.

Inagaki, M., Nishi, Y., Nishikawa, K., Matsuyama, M. & Sato, C. **Site-specific phosphorylation induces disassembly of vimentin filaments in vitro.** *Nature*. 1987; 328:649-52.

Jorgensen, KT., Wiik, A., Pedersen, M., Hedegaard, CJ., Vestergaard, BF. & Gislefoss, R. **Cytokines, autoantibodies, and viral antibodies in pre-morbid and postdiagnostic sera from patients with rheumatoid arthritis-case-control study nested in a cohort of Norwegian blood donors.** *Ann Rheum Dis*. 2008; 67: 860-6.

Kang, CP., Lee, HS, Ju, H., Cho, H., & Bae, S. **A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans.** *Arthritis & Rheum*. 2006; 50: 90-96.

Kinloch, A., Tatzler, V., Wait, R., Peston, D., Lundberg, K., Donatien, P., Moves, D., Taylor, PC., & Venables, PJ. **Identification of citrullinated alpha-enolase as candidate autoantigen in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther*. 2005; 6: 1421-9.

Kinloch, A., Lundberg, K., Wait, R., Wegner, N., Ham Lim, N., Zendman, AJ., Saxne, T., Malmström & Venables, PJ. **Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis.** *Arthritis & Rheum*. 2008; 58: 2287-2295.

Kroot., EJ. de Jong, BA. & van Leeuwen, MA. **The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis.** *Arthritis & Rheum*. 2000; 43: 1831-5.

Kunkel, HG., Franklin, EC. & Muller-Eberhard, HJ. **Studies on the isolation and characterization of the “rheumatoid factor”.** *J Clin Invest.* 1959; 38: 424-34.

Lee, KH., Chung, HS., Kim, HS, Oh, SH., Hu, MK., Baik, JH., Lee, S & Bang, D. **Human alpha-enolase from endothelial cells as a target antigen of anti-endothelial cell antibody in Behcet’s disease.** *Arthritis & Rheum.* 2003; 48: 2025-35.

Lundberg, K., Nijenhuis, S., Vossenaar, ER., Palmblad, K., van Venrooij, WJ., Klareskog, L. & Zendman, AJW. **Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity.** *Arthritis Res Ther.* 2005; 7: 458-67.

Majka, DS., Deane, KD., Partish, LA., Lazar, AA., Baron, AF. & Walker, CW. **Duration of preclinical rheumatoid arthritis-related autoantibody positivity increases in subjects with older age at time of disease diagnosis.** *Ann Rheum Dis.* 2008; 67: 801-7.

Matsuo, K., Xiang, Y., Nakamura, H., Masuko, K., Yudoh, K., Noyori, K., Nishioka, K., Saito, T. & Kato, T. **Identification of novel citrullinated autoantigens of synovium in rheumatoid arthritis using a proteomic approach.** *Arthritis Res Ther.* 2006; 8: R175.

Martínez, A., Valdivia, A., Pascual-Salcedo, D., Lamas, JR., Fernández-Arquero, M., & Balsa A. **PADI4 polymorphism are not associated with rheumatoid arthritis in the Spanish population.** *Rheumatology.* 2005; 44: 1263-66.

Masson-Bessiere, C., Sebbag, M., Girbal-Neahuser, E., Nogueira, L., Vicent, C. & Shensu, T. **The mayor syovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilagrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin.** *J Immunol.* 2001; 166: 4177-84.

Mechin, MC., Enji, M., Nachat, R., Chavanas, S., Charveron, M. & Ishida-Yamamoto, A. **The peptidylarginine deiminase expressed in human epidermis differ in their substrate specificities and subcellular locations.** *Cell Mol. Life Sci.* 2005; 62: 1989-95.

Menard, HA., Lapointe, E., Rochdi, MD. & Zhou, ZI. **Insights into rheumatoid arthritis derived from Sa immune system.** *Arthritis Res.* 2000; 2: 429-32.

Nakashima, K., Hagiwara, T., & Yamada, M. **Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes.** *J Biol Chem.* 2002; 277: 49562-68.

Nielen, MN., van Schaardenburg, D., Reesink, HW., van de Stadt, RJ., van der Horst-Bruinsma, IE. & de Koning, MH. **Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors.** *Arthritis & Rheum.* 2004; 50: 380-6.

Nijenhuis, RLF. & Mandema, E. **A new serum factor in patients with rheumatoid arthrhitis. The perinuclear factor.** *Ann. Rheum. Dis.* 1964; 23: 302-5.

Pancholi, V. **Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases.** *Cell Mol Life Sci.* 2001; 58: 902-20.

Pascual, GE. **Manifestaciones clínicas articulares.** Arán, ed. Tratado de Reumatología. España. 1998; 437-438.

Pratesi, F., Moscato, S., Sabbatini, A., Chimenti, D., Bombardieri, S. & Migliorini, P. **Autoantibodies specific for alpha-enolase in systemic autoimmune disorders.** *J Rheumatol.* 2000; 27: 109-15.

Pritzker, LB., Joshi, S., Harauz, G. & Moscarello, MA. **Deimination of myelin basic protein. Effect of deimination of arginyl residues of myelin basic protein on its structure and susceptibility to digestion of cathepsin D.** *Biochem.* 2000; 39: 5374-81.

Rubin, B. & Sonderstrup, G. **Citrullination of self-proteins and autoimmunity.** *Scand J Immunol.* 2004; 61: 112-20.

Saulot, V., Vittecoq, O., Charllonet, R., Fardellone, P., Lange, C., Marvin, L., Machour, N., Le Loët, X., Gilbert, D. & Tron, F. **Presence of autoantibodies to glycolytic enzyme alpha-enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis.** *Arthritis & Rheum.* 2002; 46: 1196-201.

Scott, IR., Harding, CR. & Barret, JG. **Histidine-rich protein of the keratohyalin granules. Source of the free amino acids, urocanic and pyrrolidone carboxylic acid in the stratum corneum.** *Biochim Biophys Acta.* 1982; 719: 110-17.

Sebbag, M., Chapuy-Regaud, S., Auger, I., Petit-Texteira, E., Clavel, C. & Nogueira, L. **Clinical and pathophysiological significance.** *Joint Bone Spine* 2004; 71: 493-502.

Sebbag, M., Moinard, N., Auger, I., Clavel, C., Arnaud, J., Nogueira, L., Roudier, J. & Serre, G. **Epitopes of human fibrin recognized by the rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins.** *Eur J Immunol.* 2006 ; 36 : 2250-63.

Sebbag, M., Simon, M., Vicent, C., Masson-Bessiere, C., Girbal, E. & Durieux, JJ. **The antiperinuclear factor and the so called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies.** *J Clin Invest.* 1995; 95: 2672-79.

Shellekens, G., Visser, H., De Jong, B., Van Den Hoogen, F., & Hazes, J., **The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognize a cyclic citrullinated peptide.** *Arthritis Rheum.* 1999; 17: 689-97.

Shensu, T., Akiyama, K., Nagata, S., Watanabe, K., & Hikichi, K. **Peptidylarginine deiminase in rat pituitary in rat pituitary: Sex difference, estrous cycle-related changes, and estrogen dependence.** *Endocrinology.* 1989; 124: 2666-70.

Shensu, T., Kan S., Ogawa, H., Manabe, M. & Asaga, H. **Preferential deimination of keratin K1 and filagrin during the terminal differentiation of human epidermis.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 225: 712-19.

Suzuki, A., Yamada, R., Chang, X., Tokuhiro, S., Sawada, T. & Yamamoto, K. **Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis.** *Nat Genet.* 2005; 34: 418-26.

Suzuki, A., Yamada, R., Chang, X., Tokuhira, S., Sawada, T., & Suzuki, M. **Functional haplotypes of PADI4, encoding citrulinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis.** *Nat Genetic.* 2003; 34: 395-402.

Takahara, H., Kusubata, M., Tsuchida, M., Kohsaka, T., Tagami, S., & Sugawara, K. **Expression of peptidylarginine deiminase in the uterine epithelial cells of mouse is dependent on estrogen.** *J Biol Chem.* 1992; 267: 520-25.

Takahara, H., Okamoto, H., & Sugawara, K. **Calcium-dependent properties of peptidylarginine deiminase from rabbit skeletal muscle.** *Agric Biol Chem.* 1986; 272: 27893-901.

Tarcsa, E., Marecov, L., Mei, G., Melino, G. & Lee, S. **Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filagrin.** *J Biol Chem.* 1996; 271: 30709-716.

Tarcsa, E., Marekov, L., Andreoli, J., Idler, W., Candi, E. & Chung, S. **The fate of trichohyalin. Sequential post-translational modifications by peptidylarginine deiminase and transglutaminases.** *J Biol Chem.* 1997; 272:27893-901.

Tilleman, K., Steendam, K., Cantaert, T., De Keyser, F., Elewaut D & Deforce, D. **Synovial detection and autoantibody reactivity of processed citrulinated isoforms of vimentin in inflammatory arthritides.** *Rheumatology.* 2008; 47: 597-604.

van der Helm-van, AH., Verpoort, KN., Breedveld, FC., Toes, RE. & Huizinga, TW. **Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther.* 2005; 7: 949-58.

van Venrooij, WJ., & Pruijn, GJ. **Citrullination: A small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res.* 2000; 2: 249-51.

Vermeulen, N., Arijs, L., Joossens, S., Vermeire, S., Clerens, S., Van den Bergh, K., Michiels, G., Arckens, L., Shuit, F., Van Lonunel, L., Rutgeerts, P. & Bossuvt, X. **Anti-enolase antibodies in patients with inflammatory Bowel disease.** *Clin Chem.* 2008; 54: 534-41.

Vossenaar, ER., Despres, N., Lapointe, E., Van Der Heijden, A., Lora, M., Senshu, T., van Venrooij, WJ., & Menard, HA. **Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin.** *Arthritis Res Ther.* 2004, 6: 142-50.

Vossenaar, ER., Zendman, AJ., van Venrooij, WJ., & Pruijn, GJ. **PAD, a growing family of citrullinating enzymes: Genes, features and involvement in disease.** *Bioessays.* 2003; 25: 1106-18.

Wang, Y., Wysocka, J., Lee, Y., Pelin, JR. & Leonelli, L. Human **PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination.** *Science.* 2004; 306: 279-83.

Wordsworth, P. **The immunogenetics of rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis.* 1991; 50: 62-65.

Xiaofenz, M., Maixing, L., Xinping, D., Tian, E., Xiodan, Gan,Y., Shi, Q., & Song, E. **Diagnostic Value of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody in Patients with Rheumatoid Arthritis.** *J Rheumatol.* 2003; 30: 1451-5.

Young, BJ., Mallya, RK., Leslie, RD., Clark, CJ. & Hamblin, TJ. **Antikeratin antibodies in rheumatoid arthritis.** *Br. Med J.* 1979; 2: 97-9.

Abreviaturas

AKA= Anticuerpos antiqueratina

anti-CM= Anticuerpos anti-citrulina modificada

Anti-CCP= Anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados

APC= Anticuerpos anti-proteínas citrulinadas

APF= Anticuerpos anti-factor perinuclear

AR= Artritis Reumatoide

CAR= Colegio Americano de Reumatología

CII= Colágeno tipo II

CL/SM= Cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas

CM= Crioglobulinemia mixta

Da= dalton

DTT= Ditiotreitól

E-2D= Electroforesis en dos dimensiones

EDTA= Etildiaminotetraacético

EII= Enfermedad inflamatoria intestinal

ELISA= Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima

EMTC= Enfermedad mixta del tejido conjuntivo

ES= Esclerosis múltiple

FA= fosfatasa alcalina

Fc = Fracción cristalizable

FMDE= Fármacos modificadores de la enfermedad

FR= Factor Reumatoide

hCI= colágeno tipo I humana

hCII= colágeno tipo II humana

HEp-2= Línea celular epitelial de carcinoma humano

HRP= Peroxidasa de rábano

IEF= Isoelectroenfoque

IFP= Interfalángicas proximales

IPG= Gradiente de pH inmovilizado

kDa= Kilodalton

kb= kilobases

LEG= Lupus eritematoso generalizado

MCF= Metacarpofalángicas
MTF= Metatarsofalángicas
MPTs= Modificaciones pos-traduccionales
PAD= Peptidil-arginina-deiminasa
padi= Genes que codifican para las PADs
PBM= Proteína básica de mielina
PBS-T= Solución amortiguadora de fosfatos /Tween 0.05%
pI= Punto isoeléctrico
PMSF= Fenilmetasulfonil fluoruro
RNAm= Mensajero del ácido ribonucleico
SDS-PAGE= Electroforesis en gel de poliacrilamida/dodecilsulfato de sodio
SNPs= polimorfismos de un solo nucleótido
SSP= Síndrome de Sjögren primario
TA= Temperatura ambiente
VIH= Virus de inmunodeficiencia humana