



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CARACTERIZACION INMUNOQUIMICA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS  
CITRULINADAS PRESENTES EN DONADORES SANOS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

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

PRESENTA:

**JOSÉ LUIS GARCÍA HERNÁNDEZ**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS GUILLERMO LLORENTE PETERS.  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: DR. EDMUNDO DE IBIS LAMOYI VELÁZQUEZ.  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.  
DR. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO.  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

**MÉXICO, D.F. SEPTIEMBRE, 2014**



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 23 de junio de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **GARCÍA HERNÁNDEZ JOSÉ LUIS** con número de cuenta **97195584**, con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN INMUNOQUÍMICA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS CITRULINADAS PRESENTES EN DONADORES SANOS"**, realizada bajo la dirección del DR. LUIS GUILLERMO LLORENTE PETERS:

Presidente: DR. RUBÉN BURGOS VARGAS  
Vocal: DR. EDMUNDO DE IBIS LAMOYI VELÁZQUEZ  
Secretario: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA  
Suplente: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO  
Suplente: DR. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 10 de septiembre de 2014

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



# Agradecimientos

---

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por la oportunidad académica brindada.

Al CONACYT por la beca 376722/240102 otorgada durante la realización de mis estudios de posgrado.

Agradezco al Dr. Luis Guillermo Llorente Peters por todo el apoyo recibido, por sus comentarios y todos los medios para que esta tesis fuera concluida con éxito.

Agradezco al Dr. Edmundo Lamoyi Velázquez por todos sus comentarios y críticas a este trabajo y por todas las facilidades para poder concluir esta tesis.

Agradezco al Dr. Erasmo Martínez Cordero por todos sus comentarios y críticas durante el desarrollo de este trabajo y por las facilidades para poder concluir esta tesis.

Agradezco a la Q.F.B Nidia Hernández Becerril, por su colaboración para la obtención de los plasmas del Banco de Sangre del INC.

Agradezco al Dr. Javier Cabiedes Contreras† por la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por todas sus enseñanzas, por su amistad y por permitirme ser partícipe de su incansable labor asistencial en beneficio de los pacientes que sufren de enfermedades autoinmunes.

# Agradecimientos a título personal

---

A Dios por haberme dado la vida y permitirme concluir este proyecto de vida con plenitud.

A mis padres José Luis y Sofía y a mi hermana, por su apoyo incondicional y constante, su motivación y sus consejos y por el ejemplo de nobleza y perseverancia que los caracteriza.

A mi compañera de vida y madre de mis hijos, Nayeli Rodríguez Fuentes, quien ha sido testigo del gran logro que significa este trabajo.

Al Dr. Carlos Núñez Álvarez, Jefe del Laboratorio de Inmunología Humoral del INCMNSZ, por los recursos recibidos para el desarrollo de este trabajo, pero sobre todo por todos sus consejos, su amistad y todo su apoyo para la conclusión del mismo.

A la cDra. Elizabeth Olivares Martínez por su apoyo, su amistad, sus comentarios y su ayuda para la estandarización de las técnicas empleadas en este proyecto.

Al personal del Laboratorio de Inmunología Humoral del Instituto Nacional de Ciencias médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” Araceli, Martha Tere y Diego por hacerme sentir parte del equipo y alegrar todos los días mi segundo hogar.

Al Dr. Octavio Velázquez de la Torre, por todo su apoyo desinteresado para realizar y concluir este proyecto.

*“La investigación enriquece la enseñanza;  
la enseñanza eleva la calidad de la asistencia y  
la asistencia abre nuevas rutas hacia la investigación”*

*Jack Masur.*

*Dedicado a Santiago y Esteban.  
Ustedes son la luz que iluminó mi vida y la llenó de bendiciones.*

*Los amo.*

*Dedicado a la memoria de mi gran Maestro,  
quien en vida fue verdaderamente “espectacular” e “increíble”.  
El legado que Javier Cabiedes quería dejarnos no parecía de este mundo,  
pero donde quiera que esté sabrá que es y será trascendente...*

# I. ÍNDICE

---

<b>1.</b>	<b>RESUMEN</b>	1
	<b>ABSTRACT.</b>	3
<b>2.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.</b>	
	2.1 Antecedentes históricos.	5
	2.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos de la artritis reumatoide.	7
	2.2.1 Características clínicas.	7
	2.2.2 Epidemiología.	9
	2.2.3 Diagnóstico.	10
	2.2.4 Tratamiento.	12
	2.3 Etiopatogenia de la AR.	13
	2.3.1 Factores ambientales.	13
	2.3.2 Factores genéticos.	14
	2.3.2.1 Importancia de los genes HLA en AR.	14
	2.3.3 Factores inmunológicos.	17
	2.3.3.1 Anticuerpos asociados con AR.	17
	2.4 Patogenicidad de los APC.	19
	2.5 Citrulinación en AR.	22
	2.5.1 Peptidil-arginina-deiminasa (PAD).	23
	2.5.2 Consecuencias generales de la citrulinación.	26
	2.5.3 Importancia de la citrulinación en AR.	27
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.</b>	31
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESIS.</b>	32
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS.</b>	32

<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	
6.1 Grupo de estudio.	33
6.2 Determinación de aPCC-II	34
6.3 Determinación de aVMC	35
6.4 Determinación de FR IgM	36
6.5 Control de calidad de los ensayos ELISA.	37
6.6 Determinación de las cuatro subclases de IgG y de los isotipos IgA e IgM.	37
6.7 Determinación de aPCC de tercera generación (aPCC-III).	38
6.8 Determinación de la distribución de las 4 subclases de IgG aPCC	39
6.9 Comparación de las proteínas citrulinadas reconocidas por los aPCC de sujetos sanos	40
6.10 Análisis estadístico.	42
<b>7. RESULTADOS.</b>	
7.1 Características demográficas de los sujetos estudiados.	43
7.2 Niveles de aPCC-II en los plasmas de donadores sanos.	43
7.3 Especificidad de anticuerpos aVMC.	46
7.4 Factor Reumatoide de isotipo IgM en plasmas aPCC-II (+).	48
7.5 Determinación de las cuatro subclases de IgG y de los isotipos IgA e IgM.	49
7.6 Niveles de aPCC de tercera generación (aPCC-III).	50
7.7 Distribución de las 4 subclases de IgG que tienen reactividad contra PCC.	51
7.8 Proteínas citrulinadas reconocidas por los aPCC de los sujetos sanos.	53
<b>8. DISCUSIÓN.</b>	57
<b>9. CONCLUSIONES.</b>	62
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.</b>	63
<b>11. ABREVIATURAS.</b>	68

# 1. RESUMEN

---

**INTRODUCCIÓN.** La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria autoinmune de etiología multifactorial, en la que se desconocen con precisión cuáles son los autoantígenos que desencadenan y mantienen la respuesta inmunológica. Los anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (APCA) han adquirido gran interés por su alta especificidad y sensibilidad para el diagnóstico y como predictores de la progresión en pacientes con AR, lo cual sugiere un papel importante de estos anticuerpos en la patogénesis de la enfermedad. La presencia de APCA y factor reumatoide (FR) en el suero de individuos clínicamente sanos se presenta años antes de desarrollar AR. Se ha reportado una asociación entre el repertorio y el título de APCA con el desarrollo de AR. No es común el análisis de anticuerpos contra autoantígenos en los plasmas de donadores sanos y no existe ninguna restricción en la transfusión de plasmas con APCA a individuos que lo requieran.

**OBJETIVO.** Estudiar la prevalencia de APCA (aPCC) en los plasmas de donadores sanos mexicanos (PDS). Analizar la distribución de las subclases de IgG con reactividad contra PCC en plasmas de sujetos sanos y sueros de pacientes con AR y artritis temprana (AT). Comparar la reactividad de los aPCC presentes en los donadores sanos con aPCC de pacientes con AR y AT.

**METODOLOGÍA.** En 315 muestras de PDS del banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, se les determinó aPCC-II y aPCC-III (IgG) mediante ELISA. En las muestras positivas se determinó la reactividad contra vimentina mutada citrulinada (VMC) y FR-IgM mediante ELISA y se compararon con sueros de pacientes con AR temprana (n=3) y pacientes con AR (n=5) con aPCC positivo (> 500 U/mL). Determinamos la distribución de subclases de IgG con reactividad contra PCC con un ELISA casero para medir anti-IgG1, IgG2,

IgG3 o IgG4 humanas. La reactividad de los PDS y de sueros de pacientes se comparó mediante electroinmunotransferencia (EIT) con lisados de células HEp-2 citrulinados *in vitro*.

**RESULTADOS.** La edad promedio del grupo estudiado fue de 33 años (rango 18-63 años) El 69% de la población fueron hombres. El punto de corte fue determinado empleando percentila 99 (30.9 U/mL). El valor promedio para aPCC fue de  $9.3 \pm 20.6$  U/mL. Se encontró una prevalencia del 1.27% (4/315) para aPCC-II. Las cuatro muestras positivas tuvieron títulos de 32.1, 338.2, 153.7 y 52.2 U/mL, respectivamente. El análisis de reactividades mostró que el 75% (3/4) PDS aPCC (+) reconocían VMC en comparación con un 100% observado en pacientes con AR y AT, adicionalmente las cuatro muestras fueron negativas para FR-IgM. Las subclases IgG1 e IgG4 son las que principalmente reconocen PCC en las muestras de AR, AT y PDS.

PDS y los sueros de pacientes reconocieron un importante número de proteínas citrulinadas (PC) en comparación con las proteínas nativas. Una proteína citrulinada de 48 kDa es reconocida por los cuatro PDS y por los sueros de AR y AT. El PDS con mayor título de aPCC (PS2: 338.2 U/mL) tuvo reactividad contra un mayor número de PC. Los PDS reconocieron proteínas en su forma no citrulinada, que dejan de ser reconocidas en su forma citrulinada evidenciando la importancia de la citrulinación en el reconocimiento antigénico. El número de bandas de PC reconocidas por los PDS correlacionó con el título de aPCC.

**CONCLUSIONES.** Se determinó la prevalencia de aPCC en sujetos sanos mexicanos, la cual es mayor a la reportada en otros estudios con poblaciones sanas de origen caucásico. El análisis de distribución de subclases de IgG demostró que existe una similitud entre los plasmas de los donadores aPCC (+) y los sueros con AR y AT aPCC (+). Los plasmas de donadores sanos con aPCC positivos reconocen PC que también son reconocidas por los sueros de pacientes con AT y AR, por lo que los aPCC encontrados en los plasmas de donadores sanos tienen similitud inmunoquímica con los encontrados en los pacientes con AT y AR.

# ABSTRACT

---

**INTRODUCTION.** Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune inflammatory disease with multifactorial etiology where the individual auto-antigens involved that trigger and maintain the immune response remain unknown. The study of anti-citrullinated proteins antibodies (ACPA) has recently acquired interest due to its high specificity and sensitivity for diagnosis and prediction of disease severity in RA patients. The data suggest an important role of ACPA in the pathogenesis of the disease. It has been reported that the occurrence of ACPA and rheumatoid factor (RF) in clinical healthy subjects' sera is seen several years before the onset of disease. The screening for auto antibodies to citrullinated proteins in plasma from healthy donors is seldom performed and there is no restriction to administrate ACPA positive plasma to individuals who require transfusion.

**OBJETIVES.** We studied the prevalence of ACPA (aCCP) in plasma of healthy Mexican donors. We analyzed the distribution of IgG subclasses with reactivity against CCP in plasma from healthy donors (PHD) and in sera from RA and early arthritis (EA) patients and compared the reactivity of aPCC present in healthy donors with that of arthritis patients.

**METHODS.** Plasma from 315 healthy donors from the Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" were tested for the presence of aCCP-II and aCCP-III (IgG) by ELISA. In positive samples we measured anti-mutated citrullinated vimentin (aMCV) and rheumatoid factor IgM (FR-IgM) by ELISA and compared them with (EA) (n=3) and RA (n=5) patients with positive aCCP (>500 U/mL). Distribution of IgG subclasses that recognize CCP was performed by a modified ELISA for quantitation of human IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4. Reactivity against *in vitro* citrullinated proteins from HEp-2 lysates of PHD, RA and EA patients was compared by Western blot.

**RESULTS.** The average age of the study group was 33 years old (range: 18-63 years), 69% of the subjects were males. The cut-off value for aPCC-II was established using the percentile 99th (30.9 U/mL). The mean  $\pm$  SD of aPCC was  $9.3 \pm 20.6$  U/mL. Prevalence of aPCC-II was 1.27% (4/315). Positive aPCC-II plasmas were PD1: 32.1, PD2: 338.2, PD3: 153.7 y PD4: 52.2 U/mL respectively. Autoantibodies anti-VMC were present in 75% (3/4) plasmas versus 100% in patients with RA and EA. RF-IgM was negative in all healthy donors' plasma. All IgG subclasses were shown to recognize CCP detected in healthy donors' plasma although at lower levels that found for RA and EA patients and IgG1 and IgG4 were the predominant subclasses with aPCC reactivity. Healthy donors' plasma and arthritis sera recognized a high number of citrullinated proteins versus not-citrullinated proteins ones. A 48 kDa citrullinated protein was recognized by all donor's plasma and RA and EA patients. The healthy donor plasma sample with the highest anti-CCP reactivity (PS2: 338.2 U/mL) recognized a high number of bands of citrullinated proteins. Healthy donors' plasma had reactivity against not-citrullinated proteins and this reactivity disappears when protein were citrullinated, a fact that highlights the importance of the process of citrullination in antigen recognition. The number of bands of citrullinated proteins recognized by donors' plasma has correlation with aCCP titer.

**CONCLUSIONS.** The prevalence of aCCP in healthy Mexican donors has been established which is than that found in Caucasian populations. The analyses of the IgG subclasses distribution demonstrate similarity between donors' plasma CCP (+), RA and EA sera. The donors' plasma aCCP (+) that recognize citrullinated proteins are also recognized by RA and EA sera, therefore the aCCP of healthy donors' plasma had immunochemical similarities with aPCC of RA and EA patients.

# 2. INTRODUCCIÓN

---

## 2.1 Antecedentes históricos

El análisis de esqueletos humanos antiguos de Europa y el norte de África demuestran la presencia de varias formas de artritis, incluyendo osteoartritis, espondilitis anquilosante y gota, sin embargo, las erosiones óseas características de la artritis reumatoide están ausentes [1]. En contraste, los estudios paleontológicos de especímenes que datan de la época precolombina muestran evidencia clara de la presencia de AR en grupos étnicos nativos de Norteamérica [2] y la prevalencia de la enfermedad en estas regiones en la actualidad es muy alta, alcanzando el 5% de casos en algunos grupos [1].

La observación de obras de arte medieval sugiere la presencia de AR en Europa desde principios del siglo XVI (**Fig. 2.1**) [3]. En 1676 Sydenham publicó el primer caso reportado. Fue a principios del siglo XIX cuando se reportaron series intermitentes de casos, destacando los del médico francés Landré-Beauvais quien reportó nueve casos de mujeres con una forma de reumatismo a la que consideró como una variante de la gota. A mediados del siglo XIX los descubrimientos de Charcot contribuyeron a diferenciar la gota de la enfermedad articular degenerativa y de la AR. Sin embargo, la enfermedad no se reconoció completamente hasta que fue definida por Sir Alfred Garrod en 1859 como “artritis reumatoide” para distinguirla de la fiebre reumática y la gota, las formas de artritis hasta ese entonces conocidas. Por su parte 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 la enfermedad. En 1924, Felty describió cinco casos de una variante de AR acompañada de esplenomegalia y leucopenia, trastorno que, a la postre, sería denominado como 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 [4].



**Figura 2.1.** Ejemplo de representaciones de enfermedades parecidas a AR en arte alemán del siglo XVI (3)

En 1957, Charles Short definió a la AR como una entidad clínica diferente a las espondiloartropatías seronegativas, a las enfermedades inducidas por cristales y al lupus eritematoso generalizado [3].

Una de las observaciones más relevantes del siglo pasado fue la descripción de Waaler en 1939, quien demostró que los eritrocitos de carnero recubiertos con anticuerpos eran aglutinados por el suero de los pacientes con AR, resultados que fueron comprobados por Rose en 1948 y en

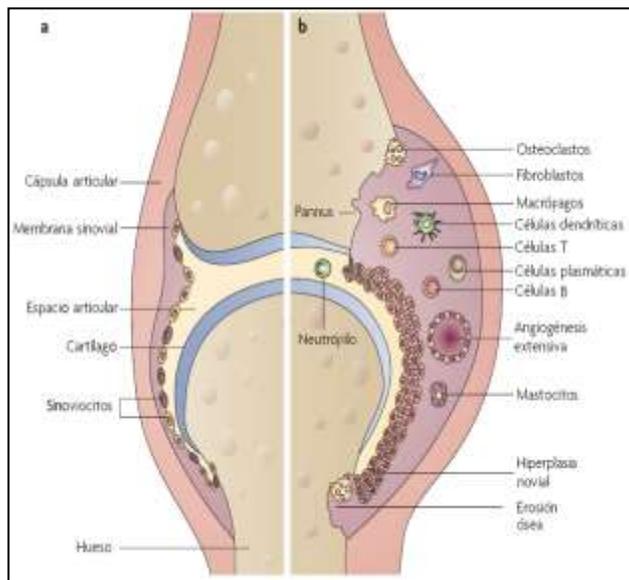
1949 Coggeshall propuso el término de “Factor Reumatoide” para definir el fenómeno descrito. Posteriormente, el factor reumatoide fue identificado como un autoanticuerpo y se caracterizó como una inmunoglobulina de isotipo IgM que reconoce la fracción cristalizable (Fc) de las inmunoglobulinas IgG. En la actualidad a esta inmunoglobulina se le conoce como FR clásico [5]. En 1973 Zvaifler demostró el papel patogénico del FR como iniciador del daño articular mediado por complejos inmunes [6]. Finalmente, la participación de las células T y B en la patología de la enfermedad fue demostrada por Stastny en 1976 [7].

## 2.2 Aspectos clínicos y epidemiológicos de la artritis reumatoide

### 2.2.1. Características clínicas

La artritis reumatoide es la artritis inflamatoria más común, y la más frecuente de las enfermedades crónicas autoinmunes sistémicas [8].

Aunque puede mostrar una gran variedad de manifestaciones sistémicas, la presentación característica de la enfermedad es la inflamación crónica de la membrana sinovial de las grandes y pequeñas articulaciones diartroidales de manera simétrica. 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. El curso clínico de la enfermedad es muy variable y se extiende desde una artritis leve autolimitada con mínimo daño articular a una inflamación multisistémica progresiva con marcado deterioro funcional, caracterizado por pérdida del cartílago, presencia de erosiones óseas y daño en estructuras blandas como ligamentos, tendones, músculos o meniscos, estas manifestaciones clínicas son responsables de la discapacidad que produce la enfermedad (**Fig. 2.2**) [9].



**Figura 2.2.** Esquema de una articulación normal (a) y una articulación afectada por AR (b). En la AR la membrana sinovial sufre hiperplasia e infiltración crónica de células inflamatorias [9].

Existen además múltiples manifestaciones extra-articulares que pueden aparecer a través del tiempo. (Tabla 2.1) [10].

<b>Tabla 2.1. Manifestaciones extra-articulares de la AR</b>	
<b>Sistema orgánico</b>	<b>Manifestaciones</b>
Piel	Nódulos reumáticos, vasculitis
Ocular	Queratoconjuntivitis sicca, iritis, episcleritis
Oral	Inflamación salivar (síntomas sicca)
Respiratorio	Fibrosis pulmonar, efusión pleural, inflamación cricoaritenoides
Cardíaco	Inflamación pericardial, formación de nódulos valvulares, miocarditis
Neurológico	Mononeuritis, pinzamiento de nervios, inestabilidad cervical
Hepático	Concentración aumentada de aminotransferasa
Hematológico	Anemia, trombocitosis, leucocitosis, linfadenopatía
Vascular	Vasculitis

En la mayoría de los pacientes la AR se presenta como una poliartritis crónica progresiva con un marcado deterioro funcional, un profundo impacto en la calidad de vida y consecuencias socioeconómicas muy importantes para el paciente y los servicios de salud [11].

Los pacientes con AR reducen su esperanza de vida entre 5 y 10 años. La gravedad de la enfermedad, su actividad y la discapacidad están fuertemente asociadas a una mortalidad prematura en estos pacientes [12].

### 2.2.2. Epidemiología

La AR tiene una distribución mundial. La prevalencia global aproximada es del 1% teniendo una máxima del 5-6% en algunas poblaciones nativas norteamericanas, y una mínima del 0.3-0.6% en algunas regiones asiáticas por lo que la prevalencia varía dependiendo de la región geográfica o grupo étnico. No se han reportado áreas geográficas o razas libres de la enfermedad. La incidencia en los países del sur de Europa es menor que en los países del norte y que en los de América. La incidencia y gravedad son aparentemente menores en áreas rurales de África y en personas de raza negra del Caribe. Como en la mayoría de las enfermedades autoinmunes, se presenta con mayor frecuencia en mujeres que en hombres en una proporción 2.5-3:1. Puede aparecer a cualquier edad, pero es más habitual entre los 40 y los 70 años, con un pico para mujeres entre los 45 y 54 años, mientras que en hombres se observa un incremento progresivo con la edad. La tercera parte de los pacientes desarrollaron AR después de los 60 años. En México, la prevalencia global se estima de 0.5 a 1% de la población [13].

### 2.2.3. Diagnóstico

El diagnóstico de la artritis reumatoide puede ser difícil debido a que su inicio es de forma gradual y por síntomas muy sutiles. Los análisis de sangre y las radiografías pueden ser normales al inicio del proceso. Los síntomas al inicio, así como las articulaciones afectadas en número y tipo, y el involucramiento de otros órganos es muy variable entre los individuos afectados; además, se sabe que otras artritis inflamatorias pueden presentar manifestaciones clínicas típicas de la AR. Es por ello que el diagnóstico de la AR se fundamenta primordialmente no sólo por la presencia de datos positivos de AR, sino por la detección y suma de diferentes manifestaciones clínicas características. A este respecto, la utilidad de los criterios de clasificación para AR propuestos por el Colegio Americano de Reumatología (CAR) en 1987, establecidos con base en las características clínicas de pacientes con AR de 10 años de evolución, fue cuestionada por su falta de sensibilidad (80.9%) y especificidad (88.2 %) en las etapas tempranas de la enfermedad [14]. Por el contrario, los criterios propuestos en el 2010, tienen como objetivo principal facilitar el estudio de las personas que se hallan en la primera etapa de la enfermedad y prevenir que lleguen a un estado de AR crónica que da lugar a los criterios de 1987. Se basa en una escala de evaluación de 0 a 10 puntos, siendo el punto de corte para diagnosticar a un paciente con AR “definida”  $\geq 6$  puntos. Para que un paciente sea diagnosticado con AR “definida” se debe conocer la duración de los síntomas, hacer una evaluación articular completa, tener por lo menos una prueba serológica (FR o APCA) y una medida de la respuesta de fase aguda ya sea velocidad de sedimentación globular (VSG) o proteína C-reactiva (PCR). Un paciente puede cumplir con la definición de AR sin necesidad de realizar todas las pruebas. Este esquema de clasificación está diseñado para contar con una forma estándar de identificación del subgrupo de individuos que se presenta con una artritis inflamatoria en las articulaciones periféricas, sin diagnóstico etiológico y

para quienes el riesgo de persistencia de los síntomas o daño estructural es suficiente para considerar el tratamiento con fármacos modificadores de la enfermedad (**Tabla 2.2**).

<b>Tabla 2.2.</b> Conjunto de variables y puntuación de cada una para el <b>registro</b> global. Un paciente será clasificado de AR si la suma total es igual o superior a 6	
<b><i>Afectación articular</i></b>	
1 articulación grande afectada	0
2-10 articulaciones grandes afectadas	1
1-3 articulaciones pequeñas afectadas	2
4-10 articulaciones pequeñas afectadas	3
> 10 articulaciones pequeñas afectadas	5
<b><i>Serología</i></b>	
FR y APCA negativos	0
FR y/o APCA positivos bajos (< 3 VN)	2
FR y/o APCA positivos alto (> 3 VN)	3
Reactantes de fase aguda	
VSG y PCR normales	0
VSG y/o PCR elevadas	1
<b><i>Duración</i></b>	
<6 semanas	0
≥6 semanas	1
APCA: anticuerpos contra proteínas citrulinadas; FR: factor reumatoide; PCR: proteína C reactiva; VN: valor normal; VSG: velocidad de sedimentación globular.	

La finalidad no es crear unos criterios diagnósticos o una herramienta de derivación para médicos generales, sino desarrollar unos nuevos criterios de clasificación que faciliten el estudio de pacientes en estadios precoces de la enfermedad. Los nuevos criterios que redefinen la AR, reflejan la esperanza colectiva de que en el futuro, la AR ya no se caracterizará por la enfermedad articular erosiva y la persistencia de los síntomas, aunque estas características continuarán definiendo a la enfermedad establecida o de larga evolución sin tratamiento [15].

## 2.2.4 Tratamiento

El tratamiento para pacientes con AR ha mejorado espectacularmente en los últimos 25 años, pudiendo ofrecer a la mayoría de los pacientes una considerable mejoría de sus síntomas y el mantenimiento de su capacidad funcional en niveles casi normales. A pesar de que no existe un tratamiento curativo, el objetivo del tratamiento consiste en conseguir remisiones completas en los pacientes, el mantenimiento de su capacidad funcional y de su calidad de vida [16].

En la última década, se ha propuesto que el tratamiento de la AR debe ser fuerte y temprano, con los llamados fármacos modificadores de la enfermedad (FARME), si se quiere evitar el daño radiográfico y el deterioro funcional. Entre estos fármacos se incluyen el oro intramuscular, metotrexato, cloroquina, sulfasalazina, azatioprina y *d*-penicilamina. La administración de pequeñas dosis de corticoesteroides ayuda a controlar los síntomas, mantener la funcionalidad y además disminuye la progresión de la enfermedad. Para las manifestaciones extra-articulares, pueden requerirse tratamientos con dosis elevadas de corticoesteroides y otros fármacos. El ejercicio es importante para mantener la función. La aplicación de calor y frío y la protección articular pueden disminuir el dolor. El éxito del tratamiento depende de su diagnóstico temprano y de una terapia agresiva antes de que se produzca un deterioro funcional o un daño irreversible en las articulaciones. El tratamiento óptimo a todo lo largo de la enfermedad, depende de un abordaje multidisciplinario, incluyendo educación del paciente [17].

## 2.3 Etiopatogenia de la AR

La AR ha sido considerada como una enfermedad autoinmune aunque se desconocen con precisión cuáles son los autoantígenos que desencadenan y mantienen la respuesta inmunológica. Se considera una enfermedad multifactorial que surge como el resultado de la combinación de factores ambientales, factores genéticos y factores inmunológicos [18].

### 2.3.1 Factores ambientales.

La Información sobre los factores ambientales con importancia para el desarrollo o el curso de la AR es sorprendentemente escasa. El tabaquismo es el único factor ambiental convencional que se ha asociado con un incremento en el riesgo de padecer AR en diferentes poblaciones [19-21]. Otros factores como el polvo de sílice y el aceite mineral también han sido reportados en algunos estudios [22, 23].

Diversos estudios en infectología han demostrado que algunas micobacterias y virus son capaces de provocar una poliartritis crónica similar a la AR, por lo que se ha sugerido que algunos estímulos infecciosos podrían ser un factor desencadenante de la enfermedad [24].

Existen datos contradictorios en cuanto a la administración exógena de hormonas femeninas, e incluso se ha llegado a sugerir que tienen un efecto preventivo en el desarrollo de la enfermedad [25].

La característica principal de los estudios sobre factores ambientales ha sido la falta de información que aporte conocimiento sólido sobre el cómo y el porqué, pueden estar asociados con el desarrollo de AR.

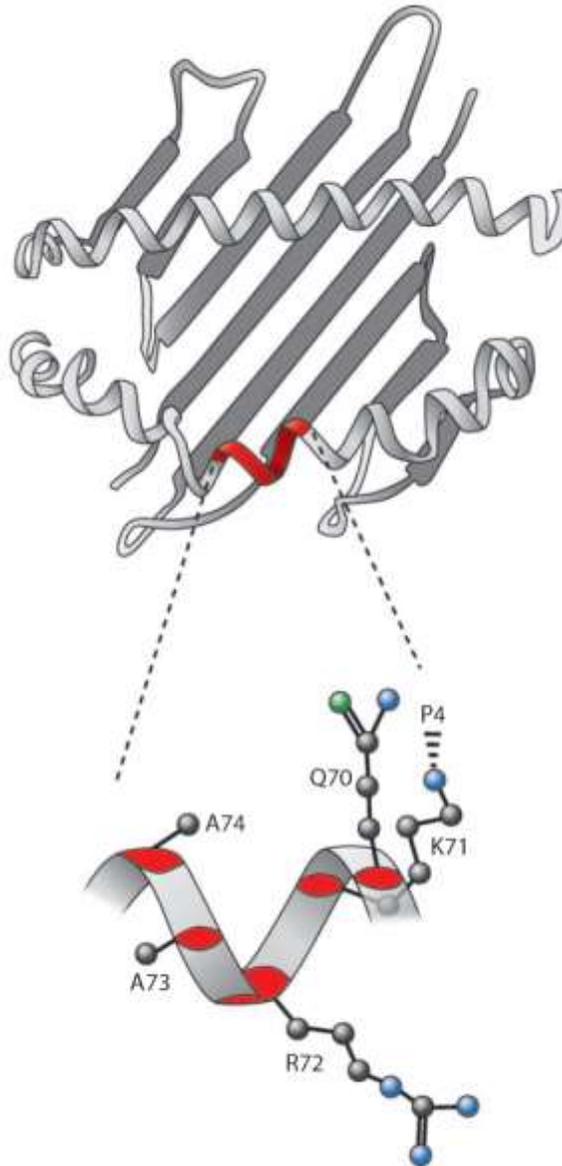
### 2.3.2 Factores genéticos

Los factores genéticos tienen un impacto sustancial sobre la susceptibilidad a AR. La prevalencia de la enfermedad en la población general se encuentra en un rango entre 0.24 a 1.0%, incrementando de 2 a 4% en familiares de pacientes. La contribución genética total para el riesgo de desarrollar AR se ha estimado en 60%, la cual fue determinada mediante estudios en gemelos homocigotos y dicigotos [26].

Se considera una enfermedad genética compleja ya que son numerosos alelos los que contribuyen a la susceptibilidad, pero que de manera individual tienen un riesgo de moderado a bajo.

#### 2.3.2.1 Importancia de los genes HLA en AR

De entre los alelos de riesgo para AR, los del HLA (*human leukocyte antigen*) son los más importantes, ya que aportan del 30 al 50% del total de la susceptibilidad genética para la enfermedad [27]. En 1978, Stastny reportó una mayor frecuencia del alelo *HLA-DRB1\*04* en pacientes con AR (78%) que en su grupo control (28%). A partir de entonces diversos estudios han demostrado que los alelos del HLA-DRB1:\*0101, \*0102, \*0401, \*0404, \*0405, \*0408, \*0409, \*0410 y \*1001, son los que tienen la asociación más fuerte con AR [8]. El producto de estos alelos comparte una secuencia de 5 aminoácidos en la tercera región hipervariable (aa 70-74) de la cadena  $\beta$  de la molécula del MHC (*major histocompatibility complex*) II. Estos resultados llevaron a la formulación de la hipótesis del “epítipo compartido” (EC) (**Fig. 2.3**). Esta región permite distinguir a los alelos asociados con la enfermedad de los que no confieren riesgo para AR. En estudios recientes, en cohortes europeas, se ha demostrado que la presencia de aPCC tiene una fuerte asociación con los pacientes con AR EC (+), y esta asociación se incrementa significativamente cuando se presentan dos copias del alelo. Estos estudios han sido reproducibles en cohortes norteamericanas [27].



**Figura 2.3.** Esquema de la región del epítipo compartido. Se ilustra la posición de los aminoácidos comunes. A=Alanina, R=Arginina, Q=Acido aspártico y K=Lisina [28].

Un análisis reciente de los alelos del HLA-DRB1 en pacientes franceses con AR, realizado por Tezenas du Montcel y colaboradores, ha propuesto un esquema de clasificación de los alelos incorporando una escala de riesgo para el desarrollo de AR basada en los aminoácidos 70-74, (Tabla 2.3). Debido a que todos los alelos comparten la secuencia Arg-Ala-Ala en las posiciones 72-74, proponen que los aminoácidos 70 y 71 son los que modulan el riesgo de la AR. En la posición 71, la Lys se asocia al mayor riesgo, Arg a un riesgo intermedio y Ala o Glu a un riesgo

bajo. En la posición 70, Gln o Arg son los que confieren el mayor riesgo, pero la Asp se asocia a un riesgo bajo [29]. Estudios repetidos en cohortes tanto de Francia como de Inglaterra son consistentes con el esquema de clasificación propuesto por Tezenas du Montcel [30-32].

Alelo <i>HLA-DRB1</i>	Residuo de aminoácidos				
	70	71	72	73	74
Alelos de susceptibilidad					
<b>Alto riesgo</b>					
<b>*0401, *1303</b>	<b>Q</b>	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
<b>Riesgo Moderado</b>					
<b>*0101, *0102 *0404 *0405, *0408*1001, *1402, *1406</b>	<b>Q/R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
<b>Bajo riesgo</b>					
<b>*1501, *1502, *1503</b>	<b>Q</b>	<b>W</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
<b>*0103 *0402, *1301, *1302, *1102, *1103</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
<b>*1202, *16</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>A</b>
Alelos de no susceptibilidad					
<b>*03</b>	<b>Q</b>	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>G</b>	<b>R</b>
<b>*0403, *0407</b>	<b>Q</b>	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>E</b>
<b>*07</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>
<b>*08</b>	<b>D</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>L</b>
<b>*09</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>E</b>
<b>*14 (excepto *1402 y *1406)</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>A</b>	<b>E</b>

**Tabla 2.3** Clasificación propuesta por Tezenas du Montcel del HLA-DRB1. [29]

A pesar del considerable progreso en la comprensión de la asociación del HLA-DRB1 con AR, así como la estructura y función de las moléculas HLA-DR, los mecanismos por los cuales determinados alelos HLA-DRB1 predisponen al desarrollo de la AR permanecen desconocidos. Si bien se han propuesto modelos que incluyen la selección de células T patogénicas durante la selección en el timo, la presentación de "péptidos artritogénicos" a células T efectoras periféricas, y la falta de generación apropiada de células T-reguladoras, estos aún no han explicado la patogenia de la AR [28].

## 2.3.3 Factores inmunológicos

### 2.3.3.1 Anticuerpos asociados con AR

Se sabe que una amplia variedad de autoanticuerpos dirigidos contra diferentes autoantígenos pueden ser detectados en el suero de pacientes con AR e históricamente, el factor reumatoide ha sido el marcador serológico más utilizado en el diagnóstico de la enfermedad, aun cuando no es tan específico de la misma. En cambio, en la actualidad, la detección de APCA ha cobrado gran interés debido a su alta especificidad (cercana al 100%) en pacientes con AR, además de que diferentes estudios se han enfocado en determinar su participación activa en la patogénesis de la enfermedad [33].

Los APCA que más se han asociado con la AR son: anticuerpos anti-factor perinuclear (APF) y anti-queratina (AKA), ambos dirigidos contra filagrina citrulinada [34]; anticuerpos anti-Sa, los cuales reconocen vimentina citrulinada [35]; y anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados (aPCC) [36]. Los aPCC han demostrado una sensibilidad mayor del 80 % y especificidad de 98 % en pacientes con AR [37]. Debido a la alta sensibilidad y especificidad y a que es posible detectarlos en etapas tempranas de la enfermedad, se les incluyó dentro de los criterios de clasificación para la AR del Colegio Americano de Reumatología en el 2010 [15].

#### I. 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 (factor reumatoide clásico). La determinación del FR es de gran utilidad en el diagnóstico de la AR, además de su valor pronóstico. Los títulos altos de FR se han asociado con mayor daño articular, progresión radiológica, incapacidad funcional y con la presencia de manifestaciones extra articulares, i.e., con una expresión más agresiva de la

enfermedad [38]. Debido a esto, el FR es considerado dentro de los criterios de clasificación para la AR del CAR de 1987 y 2010, si bien es poco específico de la enfermedad ya que puede encontrarse presente en infecciones crónicas y en otras enfermedades autoinmunes como el LEG, EMTC y el síndrome de Sjögren primario (SSP), a títulos inclusive mayores que en AR [36].

## II. Anticuerpos contra proteínas citrulinadas.

El estudio de anticuerpos diferentes al FR presentes en el suero de los pacientes con AR comenzó en 1964 con los estudios de Nienhuis y Mandema, quienes describieron por primera vez los anticuerpos anti-factor perinuclear [39]. Posteriormente en 1979, Young demostró que los sueros de pacientes con AR reaccionaban con el epitelio de esófago de rata y definieron estos anticuerpos como anti-queratina [40]. Ambos autoanticuerpos mostraron alta especificidad para la AR (entre 90 y 98%). En 1995, Sebbag reportó que tanto los AKA como los APF reconocían moléculas relacionadas con la filagrina y la profilagrina [34]. Sin embargo, en estudios posteriores en los que se utilizó filagrina recombinante (*E. coli*) o fragmentos de péptidos sintéticos de profilagrina, los sueros de pacientes con AR no mostraron reactividad. Se demostró entonces que la inmunogenicidad de la filagrina y la profilagrina estaba relacionada con modificaciones post-traduccionales (MPT) y fue posible la identificación de la profilagrina citrulinada como el antígeno reconocido por los anticuerpos AKA/APF [41]. Sin embargo, un estudio reveló que no había expresión *in vivo* de profilagrina en el tejido sinovial [42]. Fue hasta 1998 cuando se demostró que las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de fibrina citrulinadas son los antígenos reconocidos por los APCA y que están presentes en pacientes con AR [43].

## 2.4 Patogenicidad de los APCA

Clínicamente, los APCA son detectados por ELISA usando péptidos cíclicos citrulinados sintéticos (PCC). Los pacientes con títulos positivos de aPCC presentan una forma de AR más agresiva que los pacientes con AR aPCC negativos [44]. Desde la perspectiva clínica y patogénica, la distinción entre AR aPCC (+) vs AR aPCC (-) parece ser de mayor utilidad para definir dos entidades clínicas de la enfermedad que aquella basada en la presencia o ausencia del FR [28].

Se ha demostrado que en el suero de individuos clínicamente sanos, la presencia de anticuerpos aPCC antecede a la aparición de AR [45]. En ese estudio, el análisis de aPCC y FR en el suero de individuos clínicamente sanos se realizó de manera retrospectiva a partir de una sola muestra de suero y no proporciona información acerca de la modificación de los títulos de autoanticuerpos en el período anterior a la aparición de los síntomas de enfermedad o sobre anticuerpos que pudieran ser más sensibles y específicos para predecir la enfermedad.

Se ha analizado la distribución de las subclases de IgG de los aPCC en un grupo de 152 pacientes con AR y se encontró que el 99% de los pacientes tienen aPCC de subclase IgG1 y 98% de subclase IgG4 [46].

Más aún, se ha comparado esta misma distribución entre pacientes con AR, familiares sanos y con artropatías y en sujetos sanos, y se demostró que existen diferencias en el tipo de las IgG presentes en cada grupo y la importancia de la subclase IgG1, ya que se encontró presente en todos los grupos [47].

Basado en que se ha descrito 1) la acumulación de proteínas citrulinadas en los sitios de inflamación, incluyendo las articulaciones de pacientes con todas las formas de AR [48]; 2) la asociación que existe entre los pacientes con AR aPCC (+) con los alelos del HLA-DRB1 [24] y 3)

la aparición de los aPCC antes del inicio de manifestaciones clínicas de AR [45, 49] y una forma de AR más agresiva en aPCC (+) [44] se ha propuesto que los aPCC son altamente patogénicos.

En un modelo murino de artritis inducida por colágena tipo II (AIC), se demostró que la presencia de anticuerpos aPCC antecede la aparición de artritis en los ratones y, además, se encontró que cuando se induce tolerancia con un péptido citrulinado antes de la inmunización con colágena se reduce significativamente la gravedad de la artritis y el número de epítomos reconocidos por los aPCC. Por último, la transferencia pasiva de anticuerpos anti-fibrinógeno citrulinado administrados junto con la colágena tipo II superó el efecto protector de la inducción de tolerancia y provocó un incremento en la gravedad de la artritis [50].

Estos resultados confirman la importancia de los APCA como mediadores activos de la inflamación crónica en la enfermedad en el modelo de AIC.

Sin embargo la simple administración de APCA no es suficiente para desarrollar AR, lo que hace evidente la presencia de factores adicionales que desencadenen el efecto patogénico de los APCA. Uno de los factores candidatos es la misma inflamación articular la cual provoca un depósito de fibrina, el reclutamiento de células inflamatorias que expresan Peptidil-arginina-deiminasa (PAD) y la subsecuente aparición de epítomos citrulinados en las articulaciones [51].

La evidencia sobre los mecanismos patogénicos de los APCA se ha demostrado en un modelo *in vitro* donde los complejos inmunes circulantes formados por aPCC conteniendo fibrinógeno citrulinado, son capaces de inducir la secreción de TNF- $\alpha$  por macrófagos humanos, vía el receptor Fc $\gamma$ RIIa [52] y vía TLR-4 de manera simultánea [53]. Además, los complejos inmunes circulantes (CIC) que contienen fibrinógeno citrulinado están presentes en la mitad de los pacientes con AR aPCC (+) y se co-localizan con C3 en el tejido sinovial [54].

La inflamación de la sinovia de los pacientes con AR aPCC (+) se asocia con un incremento en el número de linfocitos infiltrantes y un mayor grado de destrucción articular que

en los pacientes con AR aPCC (-) [55]. Recientemente se reportó que los aPCC de pacientes con AR son capaces de activar tanto la vía clásica como la vía alternativa del complemento en un sistema *in vitro* [56].

Por lo tanto, la respuesta inmune contra los epítomos citrulinados es más sensible y específica de la enfermedad que la propia expresión del antígeno citrulinado. No se ha demostrado con claridad cuál es la implicación directa de la citrulinación sobre la patogénesis o cómo es que se pierde la tolerancia contra los epítomos citrulinados [28].

## 2.5 Citrulinación en AR

Las MPT son cambios químicos que sufren las proteínas después de ser sintetizadas. Una de éstas modificaciones post-traduccionales es la citrulinación (conversión del residuo arginina a citrulina), catalizada por la enzima PAD [57]. El estudio de ésta 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. [51].

Las MPT (e.g., fosforilación, glicosilación, citrulinación) pueden influir directamente sobre la estructura y función de las proteínas e incrementar la diversidad funcional del proteoma. Se consideran procesos biológicos comunes que alteran regiones específicas de las proteínas después de su síntesis. Debido a que casi todos los aminoácidos pueden ser modificados, se considera que casi todas las proteínas pueden ser susceptibles a MPT [57].

La citrulina no es un residuo de aminoácido natural en las proteínas, lo que justificaría su capacidad de activar la respuesta inmune. La conversión de arginina a citrulina 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). [57]. A nivel proteico, la reacción provoca una reducción de  $\sim 1.0$  Da por cada arginina modificada. La carga positiva se pierde y el punto isoelectrico también se ve modificado. Las interacciones con otras proteínas pudieran ser también alteradas [58].

### 2.5.1 Peptidil-arginina-deiminasa (PAD)

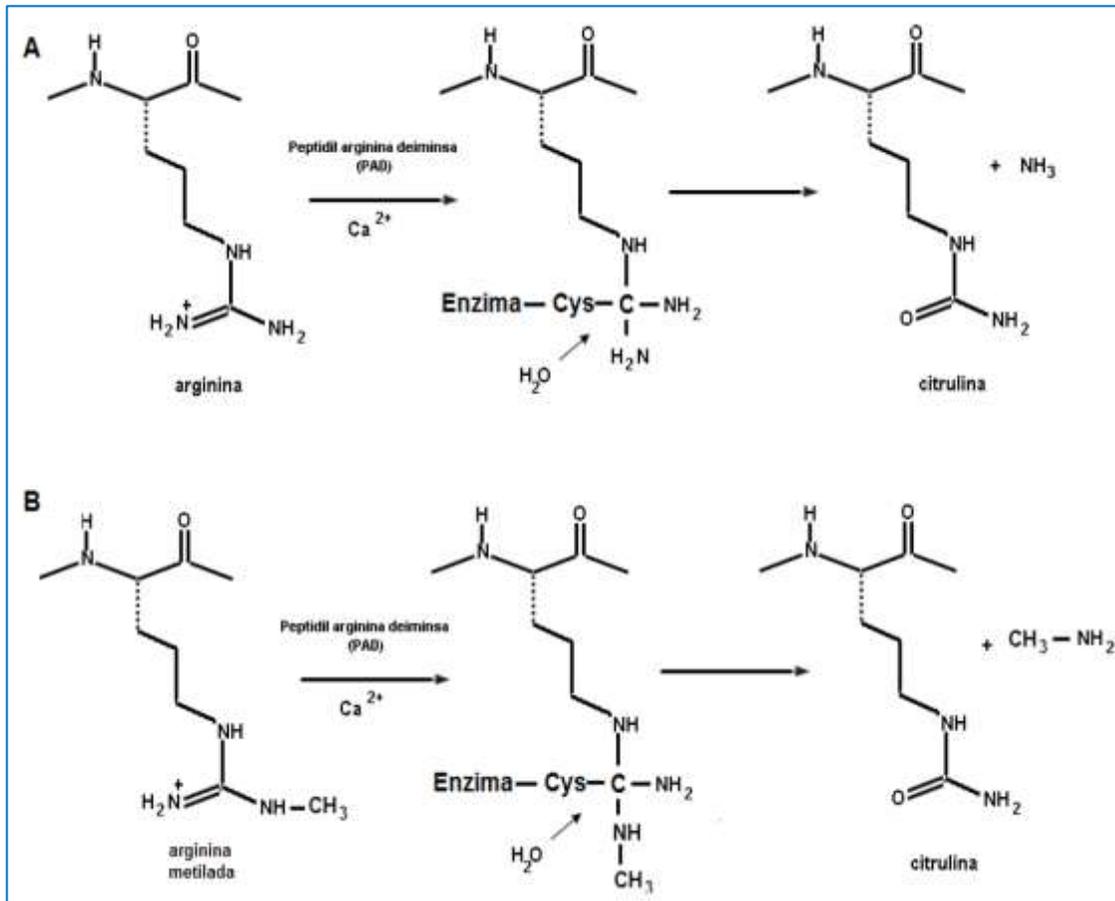
El proceso de deiminación de proteínas es catalizado por una familia de enzimas dependientes de calcio, conocidas como PAD. Se han identificado cinco isoenzimas. Su organización genómica, localización subcelular y su expresión en diferentes tejidos no se conoce totalmente.

Los genes que codifican para las PAD (*padi*) están localizados en el cromosoma 1p36.13; el tamaño de la región es de 300 Kb. Los *padi-1, -3, -5 y -6* están cercanos en una región de 160 kb. El gen *padi-2* se encuentra separado de los otros cuatro, es el más largo de ésta 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 [59].

Las isoenzimas de la PAD están ampliamente distribuidas en los tejidos de mamíferos. Así, PAD-1 se expresa predominantemente en la epidermis y útero, PAD-3 en folículos, en tanto que PAD-4 en neutrófilos y eosinófilos. La expresión de PAD-6 ha sido detectada en ovarios, testículos y leucocitos de sangre periférica. PAD2 es el miembro más ubicuo de la familia y se expresa principalmente en músculo esquelético, bazo, cerebro, glándulas salivales y útero [60].

El mecanismo propuesto para la actividad de las PAD es el siguiente: el residuo cisterna (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 C, resultando en la formación de un grupo -ceto, formando una amina primaria (**Fig. 2.4A**) [61].

Una consecuencia interesante del mecanismo de reacción de la PAD es que no sólo R, sino que también *N*'-metil-arginina puede ser transformada en citrulina (**Fig. 2.4B**), por lo que el producto liberado es metil-amina [61].



**Figura 2.4.** Mecanismo de citrulinación de la arginina y arginina metilada.

En un estudio realizado en epidermis, un factor importante en la activación de la PAD es la unión del ion calcio, además de que cada isoenzima requiere un pH diferente para su activación y la citrulinación *in vitro* sólo se observó en presencia de concentración alta de calcio [62]. Bajo condiciones fisiológicas en un rango de concentración de calcio entre  $10^{-8}$  y  $10^{-6}$  M la PAD se encuentra inactiva [63], lo que sugiere que la citrulinación ocurre sólo bajo ciertas condiciones patológicas. 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 [64].

Por otra parte, poco se conoce de la regulación de genes de éstas enzimas. Algunos estudios recientes han mostrado que *padi2* puede ser inducido por  $17\beta$ -oestradiol. Durante el ciclo menstrual, la actividad de la PAD2 cambia en las glándulas pituitarias y en el útero [65].

### 2.5.2 Consecuencias generales de la citrulinación.

El proceso de citrulinación puede cambiar la estructura primaria, secundaria y terciaria de las proteínas. Los análisis *in vitro* revelan que un alto grado de citrulinación podría desnaturalizar las proteínas. Los estudios realizados con ticohialina (THH) 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 desnaturalización 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 asumir que la citrulinación sea un proceso de desnaturalización. En general, se puede asumir que la modificación altera la estructura de la proteína y algunas veces resulta en la pérdida de organización y confiere una configuración más abierta [66] (Fig. 2.5).

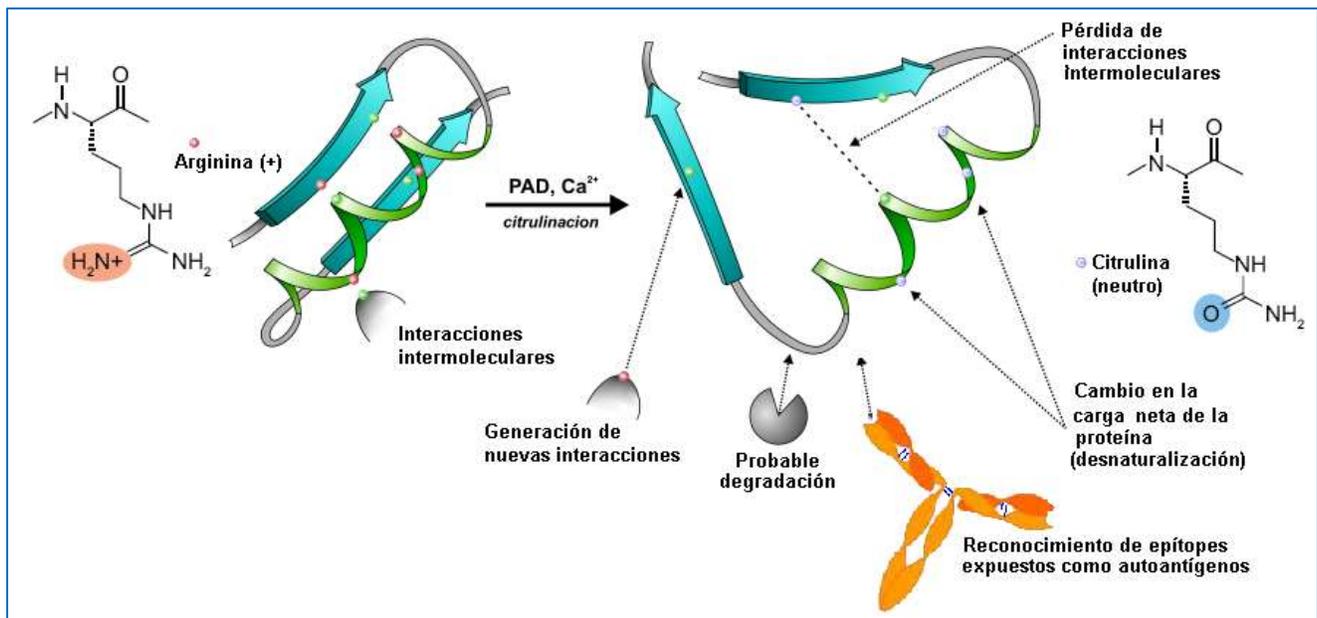


Figura 2.5. Posibles efectos de la citrulinación. Modificado de [67].

### 2.5.3 Importancia de la citrulinación en AR.

En un estudio en población japonesa, mediante análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), los autores demostraron 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 ( $p=0.000008$ ) [68].

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 o vimentina), lo cual pudiera estimular tanto la respuesta innata como la adaptativa, permitiendo, de esta manera, el desarrollo de inflamación crónica [68]. A pesar del interés generado por este estudio, no se ha corroborado en otros realizados en poblaciones con AR de Francia, Reino Unido y España [1, 69-71]. Sólo un estudio realizado en población coreana confirmó la asociación [72].

En estudios recientes se ha mostrado que el colágeno humano tipo I (hC-I) y tipo II (hC-II) son reconocidos por los APCA tanto en su forma nativa como citrulinada. En un estudio el 44% de los sueros estudiados de pacientes con AR reconocieron un péptido inmunodominante del hC-II que comprende los aminoácidos 354 al 369 [73].

En pacientes con AR los anticuerpos anti-hC-II se encuentran presentes comúnmente y carecen de valor diagnóstico. Los fragmentos del hC-II 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 a un reporte, la sensibilidad de los anticuerpos contra CB10 es del 88% comparada con el 24% de los anticuerpos contra hC-II en pacientes con AR [74].

Por otro lado, recientemente se observó que el hC-I es uno de los autoantígenos importantes en pacientes AR. También se determinó que el hC-I es uno de los sustratos de las PAD y que la citrulinación del hC-I está fuertemente correlacionada con AR. Además, los sueros de pacientes con AR que muestran reactividad contra la cadena  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  del CI citrulinado presentan una sensibilidad del 32% y especificidad del 99% [75]. En este mismo trabajo se observó una correlación mayor entre el nivel de aPCC y anti-hC-I citrulinado que entre aPCC y anti-hC-II citrulinado.

Otro antígeno importante es el conocido como antígeno Sa, ya que los anticuerpos anti-Sa son altamente específicos para AR y pueden ser detectados en aproximadamente el 40% de pacientes con AR [76]. El antígeno Sa es identificado como una doble banda de proteína de 50 kDa. Se encuentra en placenta y en el tejido sinovial de los pacientes con AR. Se ha identificado que el antígeno reconocido por los anticuerpos anti-Sa es la vimentina citrulinada [35]. Posteriormente, en un estudio de una cohorte de pacientes con poliartritis temprana se observó que los pacientes anti-Sa positivos (45%) desarrollaron manifestaciones graves a los 30 meses [77].

Los trabajos recientes en modelos de artritis inducida por colágeno tipo II (C-II), muestran la participación de la citrulinación en la respuesta autoinmune. Se demostró en un modelo de rata Lew.1AV que la citrulinación del colágeno es un potente mecanismo para incrementar la autoreactividad y que los anticuerpos APCA presentan reactividad cruzada contra colágeno citrulinado y colágeno nativo. Además, la gravedad de la artritis correlaciona con la expresión de PAD4 en el infiltrado de células mononucleares y con la cantidad de colágeno citrulinado. Por otra parte, se examinó la capacidad de las proteínas endógenas citrulinadas para romper la tolerancia inmunológica y se observó que la citrulinación de antígenos no inmunogénicos como la albúmina de suero de rata, indujo la formación de anticuerpos contra la proteína citrulinada con reactividad cruzada contra la proteína no modificada en todos los puntos investigados [33].

Considerando la evidencia anteriormente descrita, se ha propuesto un modelo de la patogénesis de la AR:

1) Al presentarse un factor ambiental externo, ya sea un traumatismo, un proceso infeccioso, el estrés o el tabaquismo, se produce una inflamación local que genera la afluencia o infiltración de células de la respuesta inmune innata, que en procesos normales se eliminan por apoptosis.

2) Cuando la apoptosis es masiva, y se añade la presencia de defectos genéticos en los mecanismos de depuración de los cuerpos apoptóticos, algunas células sufren necrosis provocando la liberación de material intracelular que incluye a las PAD activadas durante la apoptosis provocando la citrulinación de proteínas extracelulares. [58].

3) Se ha demostrado que la simple presencia de proteínas citrulinadas no es la causa de la inflamación crónica, ya que el 99% de los individuos las eliminan sin provocar respuesta inmune humoral [78]. Sin embargo, se ha demostrado que los aPCC de los individuos que presentan alelos del epítipo compartido HLA-DRB1 son capaces de reconocer péptidos citrulinados y presentarlos a células T generando una respuesta inmune contra antígenos citrulinados. Se han encontrado patrones de citrulinación específicos como péptidos procesados de vimentina citrulinada que son reconocidos por linfocitos T cuando son presentados por moléculas del MHC clase II HLA-DRB1 de pacientes con AR aPCC (+) [79].

4) Entonces se desencadena la producción de autoanticuerpos de isotipo IgG de alta afinidad contra PC. Estos anticuerpos son liberados a la circulación y forman complejos inmunes [80]. Se ha demostrado la presencia CIC que contienen fibrinógeno citrulinado y que están presentes en la mitad de los pacientes con AR PCC (+) y se co-localizan con C3 en el tejido sinovial [54] y estos son capaces de activar el complemento por la vía clásica y la vía alterna provocando una respuesta autoinmune por reclutamiento de nuevas células inflamatorias [56].

Se ha demostrado que nuevas células B productoras de IgM son reclutadas continuamente, lo que sugiere que la respuesta contra antígenos citrulinados es continuamente reactivada [46].

5) La producción de citocinas proinflamatorias también está mediada por estos autoanticuerpos ya que se ha demostrado que los CIC con fibrinógeno citrulinado pueden inducir la secreción de TNF $\alpha$  vía receptores Fc $\gamma$ RII de macrófagos [52, 53].

6) Entonces se reclutan nuevas células comenzando así un nuevo ciclo con incremento en la inflamación.

La repetición de este ciclo por años, acompañado por nuevos estímulos inflamatorios, puede llevar a la inflamación crónica manifestándose como artritis reumatoide.

No se ha establecido el umbral de autoanticuerpos necesario para pasar de una autorreactividad contra proteínas citrulinadas a la inflamación crónica característica de la AR.

Debido a la importancia de los APCA como mediadores de la patogénesis de la AR y a que su presencia antecede la aparición de la enfermedad, consideramos importante el estudio de estos anticuerpos en los donadores sanos.

# 3. JUSTIFICACIÓN

---

Los anticuerpos anti-proteínas citrulinadas son altamente específicos (98%) y sensibles (hasta el 80%) para la identificación de pacientes con AR, lo que sugiere una participación activa en la conducción de la respuesta autoinmune en la enfermedad.

La presencia de anticuerpos APCA antecede a la aparición de AR y aquellos pacientes con aPCC (+) presentan una forma de artritis más grave y agresiva.

No existe información acerca de la modificación de los títulos de autoanticuerpos en el período anterior a la aparición de los síntomas de enfermedad o sobre anticuerpos que pudieran ser más sensibles y específicos para predecir la enfermedad.

Es difícil y costoso realizar estudios de tamizaje contra autoantígenos a los plasmas de donadores, además de que no es una práctica común. No existe ninguna restricción en la administración de plasmas con anticuerpos APCA o con algún otro tipo de autoanticuerpos a individuos que lo requieran. La comparación inmunoquímica entre los aPCC en plasma de donadores sanos con los aPCC presentes en los pacientes con AR permitirá establecer de manera indirecta el posible riesgo de desencadenar una respuesta autoinmune en los sujetos que reciban la transfusión de estos autoanticuerpos.

## 4. HIPÓTESIS

---

Los aPCC a títulos altos presentes en los plasmas de donadores sanos, muestran características inmunoquímicas similares a los aPCC de pacientes con AR.

## 5. OBJETIVOS

---

- Estudiar la prevalencia de anticuerpos aPCC en los plasmas de donadores sanos mexicanos, del banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INC).
- Analizar la distribución de las subclases de IgG con reactividad contra PCC en plasmas de donadores sanos y sueros de pacientes con AR y AT.
- Comparar las proteínas citrulinadas que son reconocidas por los aPCC de sujetos sanos con las reconocidas por los aPCC de pacientes con AT y AR

# 6. MATERIALES Y MÉTODOS.

---

## 6.1 Grupo de estudio

### *Población de estudio:*

Sujetos sanos obtenidos del banco de sangre de donadores del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INC).

### *Criterios de inclusión:*

Todos los plasmas de donadores sanos con títulos de aPCC positivos.

### *Criterios de exclusión:*

Antecedentes heredofamiliares de enfermedad autoinmune en los donadores.

### *Tamaño de la muestra.*

Muestreo consecutivo, por tratarse de un estudio observacional, descriptivo y abierto, no se requiere un cálculo de tamaño de muestra. El tamaño de muestra fue de 315 muestras de plasma.

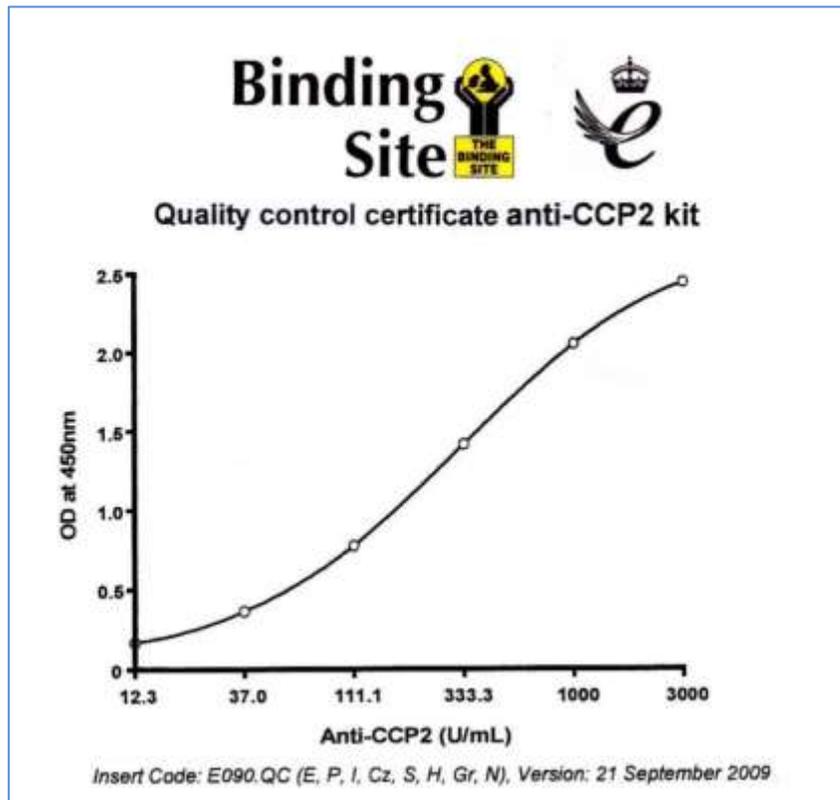
### *Obtención de la muestra.*

Se obtuvo una muestra de ~8 mL de sangre periférica en tubos con anticoagulante (K<sub>2</sub>EDTA 7.2 mg) de donadores sanos del INC, previo consentimiento informado. Las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 10 min. Posteriormente se separó el plasma, y se almacenó a -20°C hasta su posterior uso para la detección de anticuerpos aPCC.

Se seleccionaron sueros de pacientes que cumplieron los criterios del CAR (1987) para AR (n=5) y AT (n=3) del banco de sueros de la clínica de artritis del INCMNSZ con valores de aPCC-II mayores a 500 U/mL para las comparaciones con los plasmas de los donadores.

## 6.2 Determinación de anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados de segunda generación (aPCC-II).

El análisis de aPCC en los plasmas de donadores sanos se realizó mediante la técnica de ELISA con un equipo comercial (The Binding Site, Inc. Birmingham, Ing)) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El procedimiento se realizó de manera automatizada con un equipo DSX (Dynex Technologies, Virginia, EUA). En una placa de 96 pozos recubiertos con péptidos cíclicos citrulinados sintéticos de segunda generación (aPCC-II), se colocaron 100µL de calibradores, controles (proporcionados por el fabricante) y muestra de plasma de donadores a una dilución 1:100, y se incubaron 30 min a temperatura ambiente (TA). El proceso de lavado se programó en el equipo y se hicieron tres lavados con solución amortiguadora y se agregaron 100 µL de anticuerpo anti-IgG Humana (específico de cadena  $\gamma$ ) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). La placa se incubó nuevamente 30 min a TA, después de ese tiempo se repitió el proceso de lavado y se agregaron 100µL de solución de sustrato de la enzima (3, 3', 5, 5'-tetrametilbencidina, TMB) y se incubaron 30 min; finalmente se agregó la solución de paro ( $H_3PO_4$  3M) y se leyeron a 450nm en un lector de placas de ELISA. Para el cálculo de los títulos de aPCC, se utilizó el programa *revelation 5.15 del DSX*, que realiza la interpolación de la densidad óptica de las muestras en una curva estándar de cinco puntos de manera automática. (Fig. 6.1)

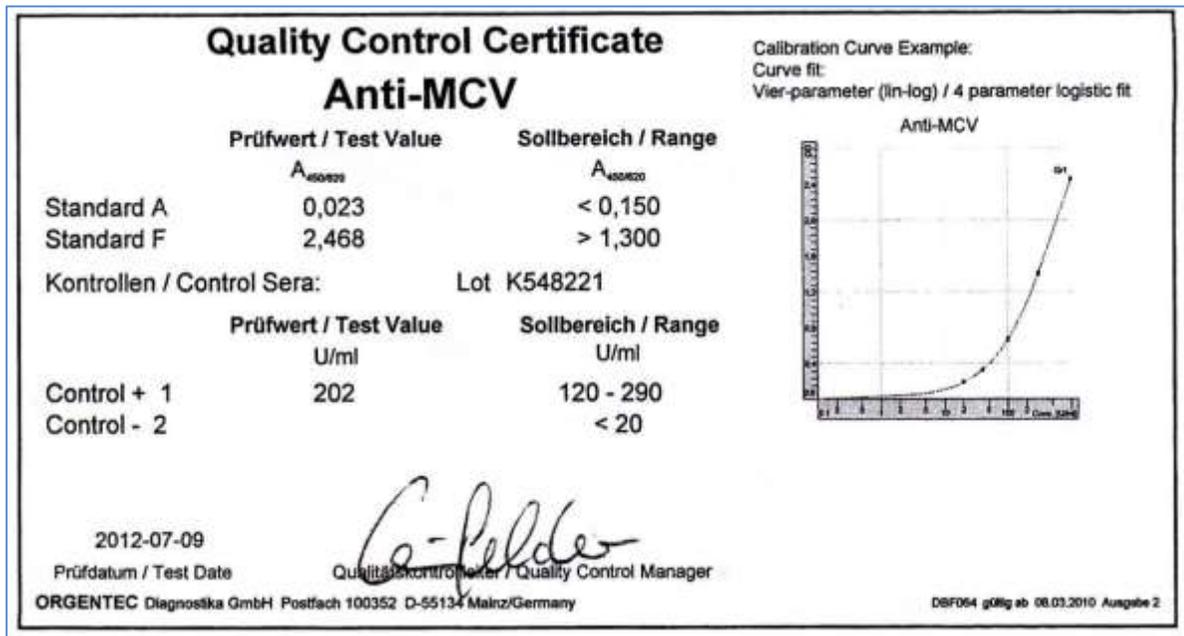


**Figura 6.1** Representación de la curva estándar de aPCC-II reportada por el fabricante.

### 6.3 Determinación de anticuerpos anti-vimentina mutada citrulinada (aVMC).

A los plasmas con anticuerpos aPCC-II positivos y sueros de pacientes con AR y AT se les determinaron aVMC mediante un ensayo de ELISA (Orgentec Diagnostica GmbH). En placas recubiertas con vimentina mutada citrulinada altamente purificada, se colocaron 100µL de calibradores, controles y muestra de plasma de donadores a una dilución 1:100 en su respectivo amortiguador, la placa se incubó durante 30 min a TA ambiente. Se realizaron tres lavados con solución amortiguadora y posteriormente se agregaron 100 µL de anticuerpo anti-IgG Humana (específico de cadena  $\gamma$ ) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). La placa se incubó nuevamente sólo 15 min a TA, después de ese tiempo se repitió el proceso de lavado y se agregaron 100µL de solución de sustrato de la enzima (TMB) y se incubaron 15 min; finalmente

se detuvo la reacción con solución de paro (HCl 1 M) y la placa se incubó por 5 min antes de leer la absorbancia a 450nm en el lector de placas de ELISA. Igual que para aPCC-II el cálculo de los títulos de aVMC, se utilizó el programa *revelation 5.15 del DSX*, que realiza la interpolación de la densidad óptica de las muestras en una curva estándar de cinco puntos de manera automática. (Fig. 6.2).

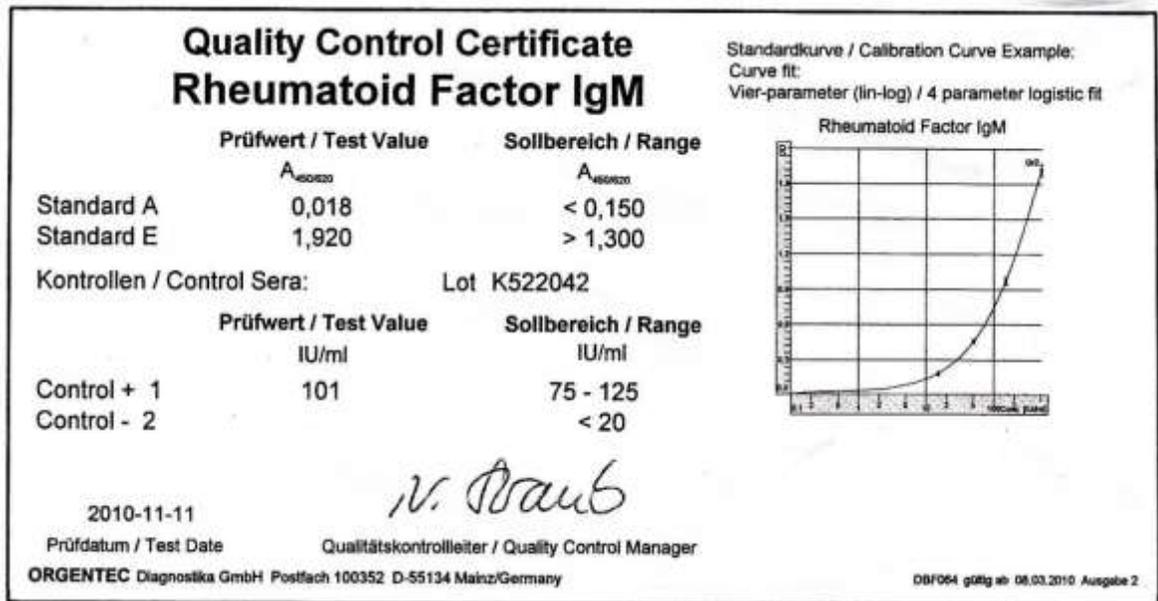


**Figura 6.2.** Representación de la curva estándar de aVMC reportada por el fabricante.

## 6.4 Determinación de Factor Reumatoide de isotipo IgM (FR IgM)

Las muestras de plasma aPCC-II positivos y sueros de pacientes con AR y AT se diluyeron 1:100 en su respectivo amortiguador. Se colocaron 100  $\mu$ L de calibradores, controles y diluciones de los plasmas en pozos recubiertos con fracciones de IgG humana (Orgentec Diagnostica GmbH, Mainz, ALE). Se incubaron durante 30 min a TA. Transcurrido el tiempo se eliminó el contenido de los pozos y se realizaron tres lavados con 300  $\mu$ l de solución de lavado. Posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ L de anti-IgM conjugado con HRP y se incubaron durante 15 min a TA. Se realizó otro ciclo de lavados e inmediatamente después se adicionaron 100  $\mu$ L de solución de paro

(HCl 1 M). Se incubaron durante 5 minutos a TA y finalmente se leyó la absorbancia a 450 nm. El cálculo de los títulos de FR IgM se realizó con el programa *revelation 5.15 del DSX* de manera automática. (Fig. 6.3).



**Figura 6.3.** Representación de la curva estándar de FR IgM reportada por el fabricante.

## 6.5 Control de calidad de los ensayos ELISA.

Todos los ensayos cumplieron con los criterios de validación de la prueba especificados para cada fabricante. Coeficiente de variación (CV%)<10.

## 6.6 Determinación de las cuatro subclases de IgG y de los isotipos IgA e IgM

En las muestras de plasmas con aPCC (+) y en sueros de AR (n=5) y AT (n=3) se cuantificaron los niveles de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgM totales mediante un ensayo cuantitativo multiplex (tecnología xMAP) con un equipo comercial de acuerdo con las especificaciones del fabricante. En resumen, cada muestra se diluyó a una concentración final 1:16000 con el diluyente de muestra (Millipore®). Se adicionaron 50 µL de las muestras, 50 µL de

los controles y 50  $\mu\text{L}$  de los calibradores en sus respectivos pozos de una placa con filtro en el fondo tratada previamente con solución de ensayo (Millipore®). A cada pozo se le adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de la suspensión de perlas recubiertas con los anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas y se incubaron 60 min en agitación constante (500 rpm) en condiciones de oscuridad. Posteriormente se eliminó el volumen por vacío y se lavaron 2 veces con 100  $\mu\text{L}$  de solución de ensayo (Millipore®), y se incubaron 60 min con 25  $\mu\text{L}$  de anticuerpo de detección anti- $\kappa\lambda$ -PE (1:100), finalizado el tiempo se eliminó el líquido por vacío y se resuspendió el contenido de los pozos con 100 $\mu\text{L}$  de líquido de corrida. La cuantificación se realizó en un equipo Luminex® LINCOplex 200®, el cual previa calibración, se programó con los parámetros descritos en el inserto del ensayo [81]. El equipo proporciona los resultados en unidades de ng/mL para cada analito interpolando la intensidad de la señal en una curva estándar de 6 puntos.

## **6.7 Determinación de aPCC de tercera generación (aPCC-III)**

El análisis de aPCC-III en los plasmas con aPCC-II positivos se realizó mediante la técnica de ELISA con un equipo comercial (INOVA Diagnostics, Inc, San Diego, CA, EUA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El procedimiento también se realizó de manera automatizada con un equipo DSX (Dynex Technologies, Virginia, EUA). En pozos recubiertos con PCC sintéticos de tercera generación, se colocaron 100 $\mu\text{L}$  de calibradores, controles y los plasmas de donadores a una dilución 1:100, y se incubaron 30 min a TA. Se hicieron tres lavados con solución amortiguadora y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo anti-IgG Humana conjugado con HRP. La placa se incubó nuevamente 30 min a TA, después de ese tiempo se repitió el proceso de lavado y se agregaron 100 $\mu\text{L}$  de solución de sustrato TMB y se incubaron 30 min; finalmente se agregó la solución de paro ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.344 M). Se incubaron 45 min antes de leer la absorbancia a

450nm en un lector de placas de ELISA. Para el cálculo de los títulos de aPCC, se utilizó el programa *revelation 5.15 del DSX*.

## **6.8 Determinación de la distribución de las 4 subclases de IgG con reactividad contra PCC.**

La distribución de las subclases de IgG con reactividad contra PCC se evaluó con un ensayo de ELISA utilizando pozos recubiertos con PCC sintéticos de tercera generación. Los plasmas con aPCC-II positivos y los sueros de pacientes con AT (n=2) y AR (n=2) se diluyeron 1:100 con el diluyente de muestra (INOVA Diagnostics, Inc, San Diego, CA, EUA) y se colocaron en los pozos con recubiertos con PCC-III por duplicado. Esto se realizó para cada subclase de IgG. Los pozos se incubaron por 30 min a TA. Concluido el tiempo se realizaron tres lavados con solución amortiguadora y se agregaron 100 µL de anticuerpo monoclonal de ratón anti IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humanas conjugados con fosfatasa alcalina (AP).

La dilución de cada anticuerpo se determinó previamente mediante una curva de diluciones seriales. Para anti-IgG1 se ocupó una dilución 1:1000, para anti-IgG2 1:12000, y para anti-IgG3 y anti-IgG4 1:4000. Los anticuerpos se incubaron durante 30 min a 37°C en condiciones de oscuridad. Posteriormente se repitió el proceso de lavado y se incubaron con 100 µL de solución de 4-nitrofenilfosfato (4nPP) durante 60 min a 37°C; transcurrido el tiempo de incubación se leyeron en un lector de placas de ELISA (TECAN) a 405nm. Los resultados se reportaron en unidades de densidad óptica (DO) una vez restado el valor del blanco.

## 6.9 Comparación de las proteínas citrulinadas reconocidas por los aPCC de los sujetos sanos y de pacientes con AT y AR

### Obtención de lisados de células HEp-2

Las células HEp-2 se cultivaron durante tres días. Se lavaron con 25mL de PBS a 4°C. Se resuspendieron en 1 mL de PBS y despegaron de la placa de cultivo con una espátula de plástico. Se transfirió todo el líquido a tubos de microcentrifuga de 1.5 mL. La suspensión de células se centrifugó a 3000 rpm por 5 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante, se deshizo el paquete y se adicionaron 100 µL de amortiguador A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 por observación en microscopio invertido. Los núcleos se empaquetaron por 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 microcentrifuga 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 microcentrifuga y se almacenó a -20° C hasta su uso.

### **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 CaCl<sub>2</sub> y 5mM DTT) y se adicionaron 5 µL de PAD2 (0.19 mg/mL) de músculo esquelético de rata (SIGMA, San Luis, MO, EUA) (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.

### **Detección de proteínas citrulinadas**

Las proteínas citrulinadas se separaron mediante SDS-PAGE al 10% a 90V y se realizó electroinmunotransferencia (EIT). Posteriormente, se 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% FeCl<sub>3</sub>, 25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; reactivo B: 2-3 butanediona monoxima, antipirina, ácido acético). Se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.05% (PBS-T) y se bloquearon los sitios inespecíficos con leche al 3% en PBS por una hora a TA. Al término del bloqueo, se incubaron las membranas con 10 mL de anticuerpo anti-citrulina modificada (aCM) 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 (anti-IgG-HRP) a una dilución 1:10 000 y se incubaron por 1 hora a 37°C. Se lavó la membrana nuevamente con PBS-T (3 lavados), un lavado con agua destilada y se adicionaron 3.0 mL de sustrato quimioluminiscente para HRP. Se expusieron las membranas durante 20 min a películas fotográficas (AGFA) y se revelaron en un equipo Kodak.

## Reactividad de plasmas y sueros contra proteínas citrulinadas y no citrulinadas

Las PC y noPC fueron separadas mediante SDS-PAGE al 10% colocando 7.5  $\mu$ g de proteínas por carril. Posteriormente se realizó EIT. La membrana se tiñó con colorante rojo de Ponceau para verificar la transferencia. Posteriormente la membrana se bloqueó con leche al 3.0 % en PBS por 1 hora. Al término del bloqueo, se cortaron los carriles tanto para PC como noPC. Se incubaron por duplicado con los plasmas de donadores sanos (n=4) y con los sueros de pacientes con AT (n=1) y AR (n=1) a una dilución 1:20 en PBS-T leche 3% durante toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente se realizaron 3 lavados con PBS-T y las tiras se incubaron 1 hora a TA con anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina (FA) a una dilución 1:5000 en PBS-T leche 3%. Transcurrido el tiempo se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS-T. Finalmente, se adicionó el sustrato para FA (NBT/BCIP) y se incubó con agitación constante por 10 min. Se dejaron secar las bandas y se escanearon para su análisis.

### 6.10 Análisis estadístico

Los puntos de corte para los aPCC-II fueron establecidos en la percentila 99. Se realizó la prueba *t* para comparaciones entre grupos. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos.

# 7. RESULTADOS

---

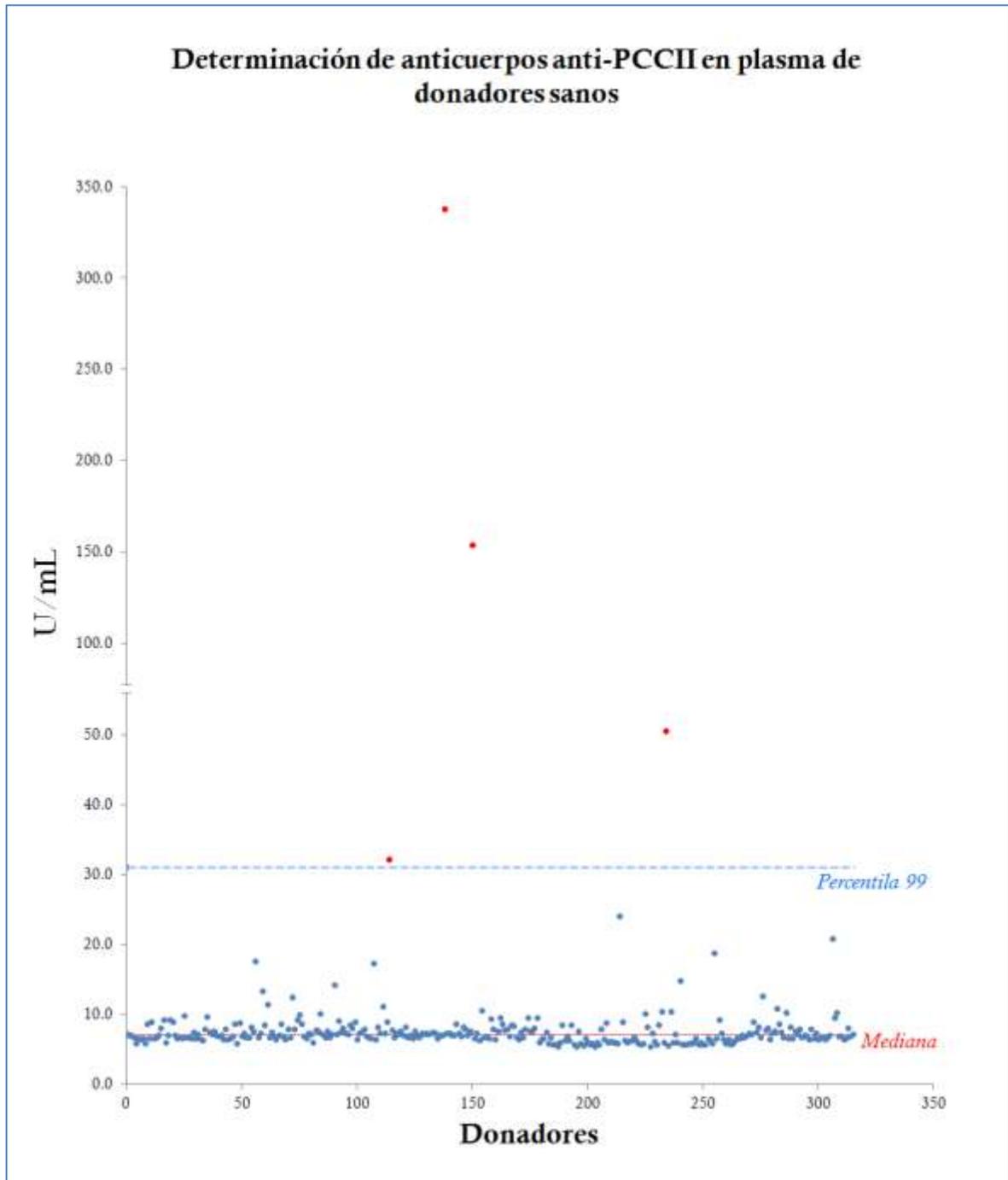
## 7.1 Características demográficas de los sujetos estudiados.

Se analizaron en total 315 muestras de plasma de donadores sanos del INC. La edad promedio fue de 33 años con un rango de 18 a 63 años. El 69% fueron varones.

## 7.2 Niveles de aPCC-II en los plasmas de donadores sanos.

A los 315 plasmas de donadores sanos se les determinaron los niveles de aPCC-II como se describe en materiales y métodos. El promedio de los títulos de anticuerpos aPCC-II de los plasmas analizados fue de  $9.3 \pm 20.6$  U/mL. La mediana fue de 7.1 U/mL.

El valor de corte para este estudio fue establecido experimentalmente en la percentila 99= 30.98 U/mL. (**Fig. 7.1**)



**Figura 7.1.** Anticuerpos aPCC de plasma de 315 donadores.

Como se puede apreciar en la **Figura 7.1**, con el punto de corte establecido, sólo cuatro muestras de plasma presentaron títulos positivos. La prevalencia de aPCC-II positivos en la población estudiada fue de 1.27%. Los valores de aPCC-II de los cuatro plasmas positivos se enlistan a continuación. (**Tabla 7.1**)

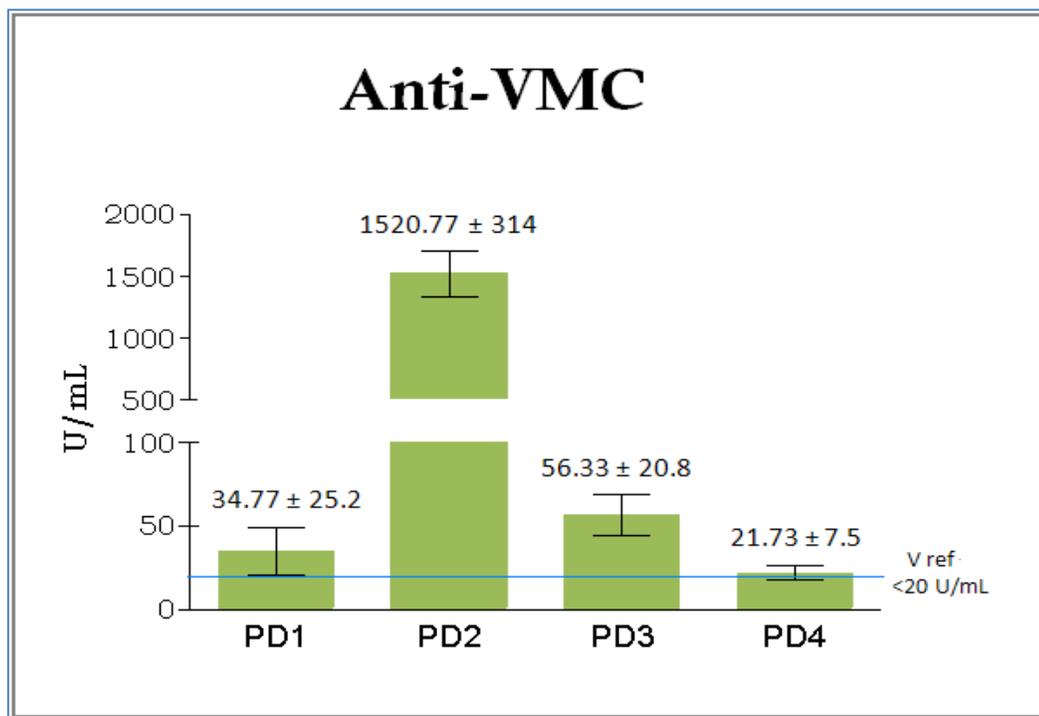
Id de Muestra	U/mL
PD 1	32.1
PD 2	338.2
PD 3	153.7
PD4	52.2
V. Ref	< 30.98

**Tabla 7.1.** Valores de aPCC-II de las cuatro muestras de plasma positivas.

De las cuatro muestras, destacan el PD2 y PD3, que presentaron los valores de aPCC-II de mayor título. Con las cuatro muestras de plasma positivas para aPCC-II realizamos la determinación de especificidad para aVMC y FR-IgM.

### 7.3 Especificidad de anticuerpos aVMC

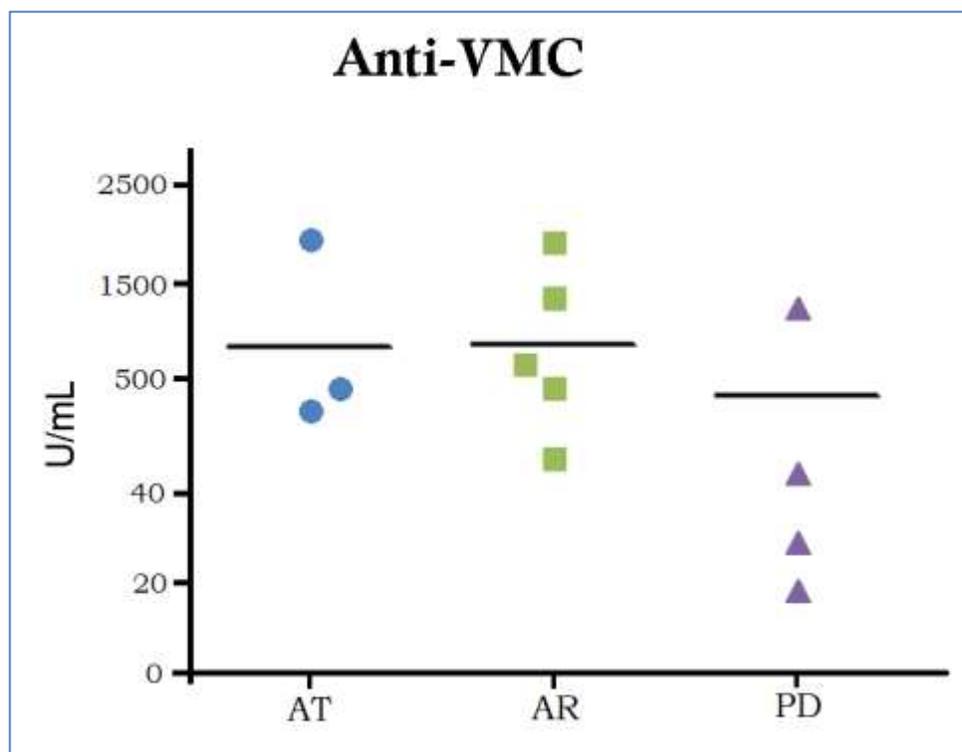
Para determinar si anticuerpos aPCC detectados en donadores sanos son capaces de reconocer vimentina citrulinada, se determinaron anticuerpos anti-VMC mediante ELISA como se describió previamente. Los PDS y el suero de pacientes con AR y AT presentaron reactividad anti-VMC, siendo el plasma PD2, de manera similar al caso de aPCC-II, el que presentó los títulos más altos de aVMC (**Fig. 7.2**)



**Figura 7.2** Valores de aVMC en plasmas de donadores sanos. Las barras representan el promedio  $\pm$  DE de cuatro ensayos independientes.

Se observó que 8/8 (100%) de los sueros con artritis (AR+AT) y 3/4 (75%) de los PDS reconocieron vimentina. Con estos datos se demuestra que los anticuerpos anti-vimentina son de los que predominan en la diversidad de los APCA.

Cuando de se compararon los títulos de aVMC de los PDS con los presentes en sueros de pacientes con AR (n=5) y AT (n=3) se observó claramente que los sueros de pacientes, sean AR o AT, presentaron títulos mayores de aVMC en comparación con los PDS. (**Fig. 7.3**).



**Figura 7.3** Valores de aVMC de pacientes con AT (n=3), AR (n=5) y PD (n=4). Se observa un mayor título de aVMC en pacientes con AR y AT que en los PD.

## 7.4 Factor Reumatoide de isotipo IgM en plasmas aPCC-II (+).

A diferencia de lo encontrado en el suero de pacientes con AR y AT, los cuatro plasmas de donadores sanos, no presentaron valores positivos de Factor Reumatoide de isotipo IgM. (Tabla 7.2)

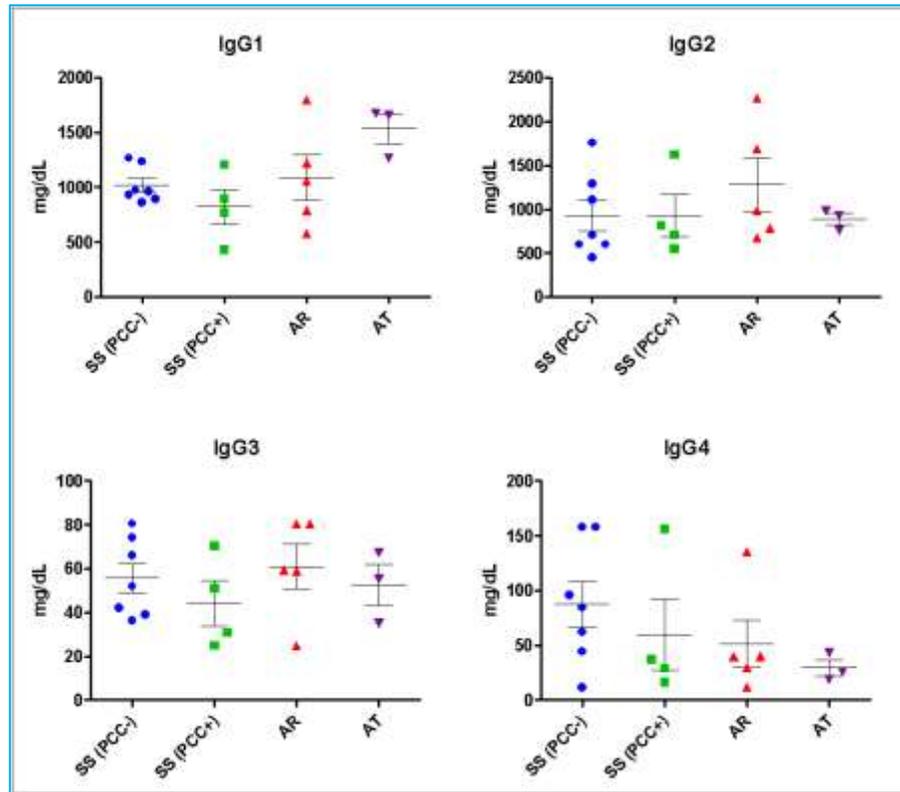
Id de Muestra	FR IgM U/mL
AT 1	124.2
AT 2	119.6
AT 3	256.1
AR 1	259.8
AR 2	18.2
AR 3	35.7
AR 4	28.8
AR 5	95.7
PD 1	9.4
PD 2	11.5
PD 3	7.0
PD4	7.1
V. Ref	< 20 U/mL

**Tabla 7.2.** Valores de FR IgM de los plasmas de donadores (n=4), sueros de pacientes con AR (n=5) y AT (n= 3).

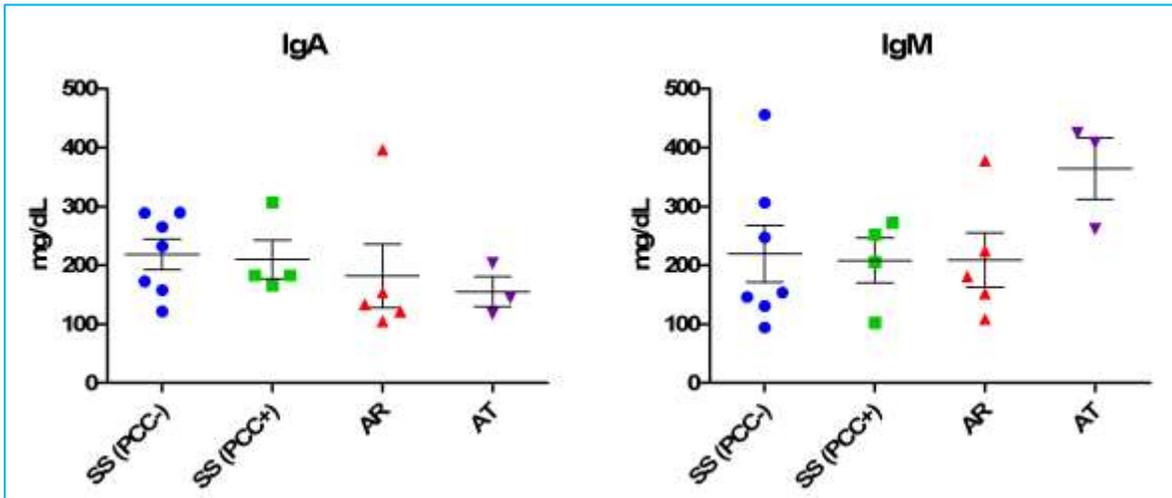
## 7.5 Determinación de las cuatro subclases de IgG y de los isotipos IgA e IgM.

En muestras de plasma con aPCC-II (+), plasma con aPCC-II (-) (n=7) y en sueros de AR (n=5) y AT (n=3) se cuantificaron los niveles totales de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgM

mediante luminometría como se describe previamente. No se encontraron diferencias entre los grupos en los niveles de las inmunoglobulinas analizadas. El plasma PD2 presentó los valores más altos de IgG2 e IgG4. (Fig-7.4-5)



**Figura 7.4.** Valores de subclases de IgG de donadores sanos aPCC (-), (n=7); aPCC (+), (n=4); sueros con AR (n=5) y AT (n=3). Media  $\pm$  DE.



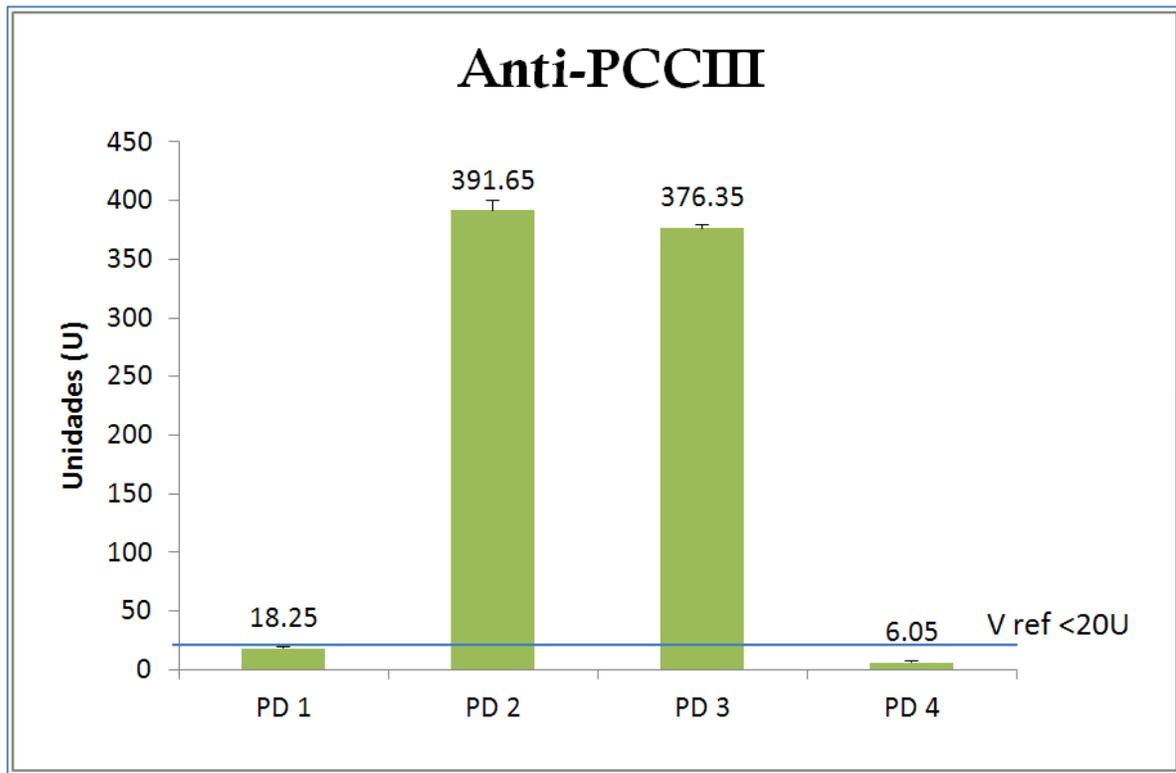
**Figura 7.5.** Valores de IgA e IgM donadores sanos aPCC (-), (n=7); aPCC (+), (n=4); sueros con AR (n=5) y AT (n=3). Media  $\pm$  DE.

## 7.6 Niveles de aPCC de tercera generación (aPCC-III)

La prueba de aPCC-III de acuerdo al fabricante, presenta péptidos citrulinados adicionales a los encontrados en el ensayo para aPCC-II. Diferentes estudios han reportado que ambas pruebas presentan la misma sensibilidad y especificidad en para detectar APCA en pacientes con AR. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que los aPCC-III tienen un mejor desempeño en pacientes con AR con factor reumatoide negativo.[82]

La detección de aPCC-III en los PDS se realizó mediante la técnica de ELISA con un equipo comercial (INOVA Diagnostics, Inc, San Diego, CA, EUA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Por este método de análisis, se observaron resultados contrastantes, ya que sólo dos PDS fueron positivos a títulos muy altos, y los plasmas restantes presentaron valores considerados negativos con el valor de referencia establecido por el fabricante.

(Fig. 7.6)

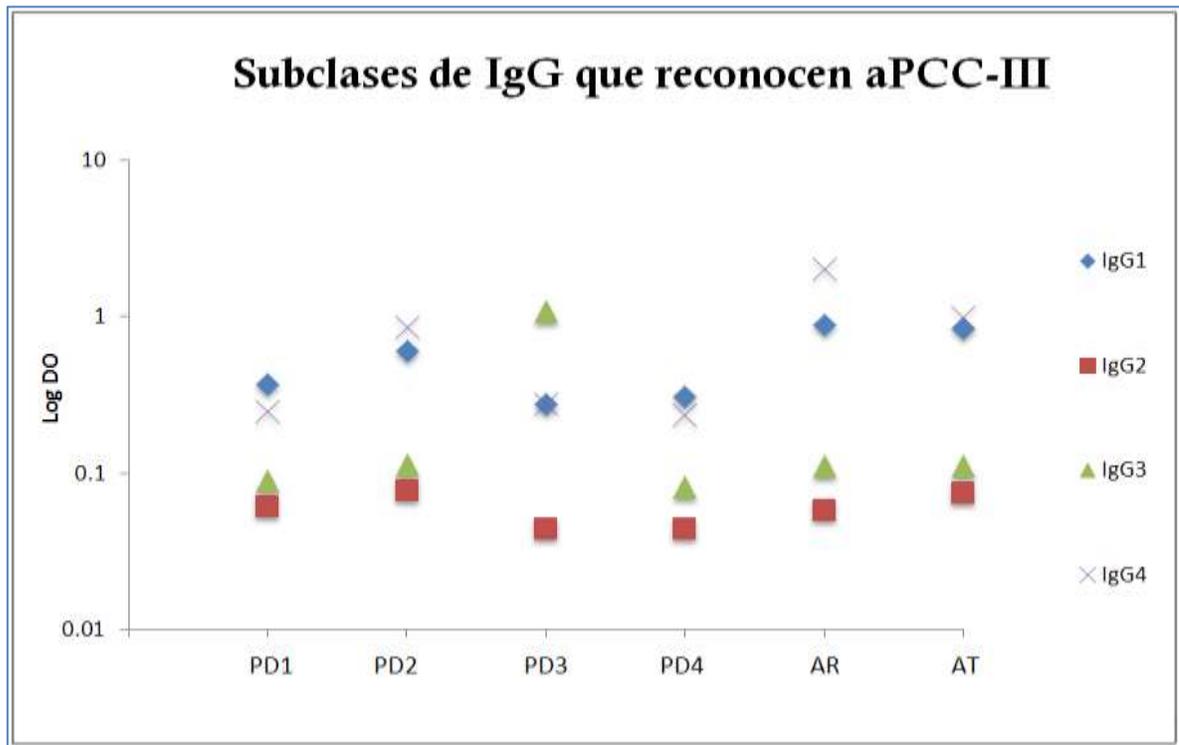


**Figura 7.6.** Valores de aPCC-III en plasmas de donadores sanos. Las barras representan el promedio de dos experimentos independientes  $\pm$  DE.

### 7.7 Distribución de las 4 subclases de IgG que tienen reactividad contra PCC.

Para caracterizar de manera más específica la reactividad contra PCCIII, determinamos la distribución de subclases de IgG mediante una modificación del ELISA para PCCIII. Los resultados se reportaron en unidades de densidad óptica (DO) una vez restado el valor del blanco.

En los plasmas de donadores sanos se observó la presencia de todas las subclases de IgG, sin embargo, es destacable la presencia mayoritaria de las subclases IgG1 e IgG4 en el PD2 y los títulos altos de aPCC en el PD3 parecen ser específicamente de la subclase IgG3. (**Fig. 7.7**)



**Figura 7.7.** Distribución de subclases de IgG en plasma (n=4), un suero con AR y un suero con AT.

## 7.8 Proteínas citrulinadas reconocidas por los aPCC de los sujetos sanos comparadas con las reconocidas por pacientes con AT y AR

La comparación de la reactividad de los aPCC de sujetos sanos contra homogenizados citrulinados de células HEp-2 se realizó mediante EIT como se describió previamente.

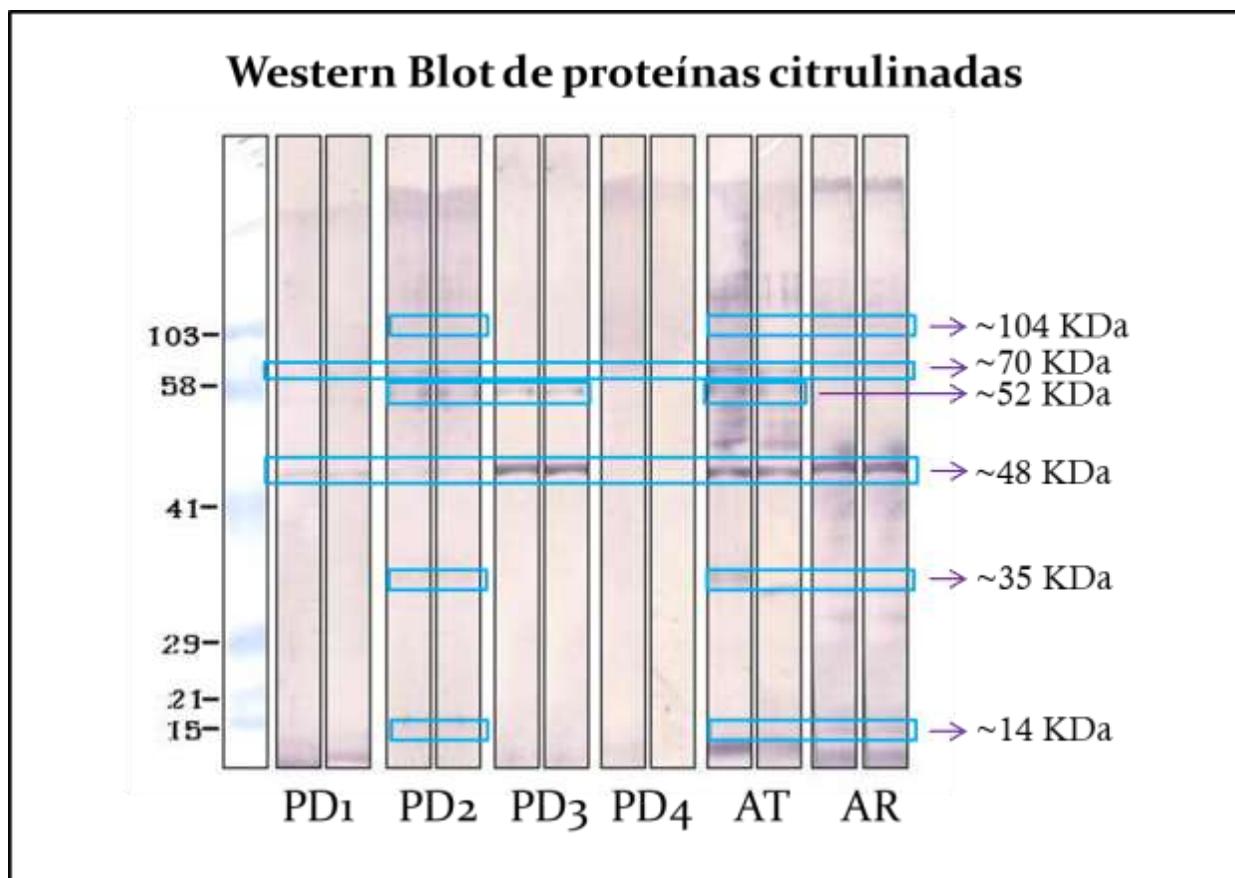
Se comprobó la efectividad de la citrulinación *in vitro*, con un anticuerpo comercial anti-citrulina modificada el cual sólo reconoció al homogenizado de células HEp-2 citrulinado (**Fig. 7.8**).



**Figura 7.8.** Imagen del homogenizado citrulinado y no citrulinado que demuestra que la citrulinación *in vitro* fue satisfactoria.

Con este resultado se procedió al análisis de la reactividad de los plasmas de donadores sanos y los pacientes con AR.

Los PDS aPCC (+) y los sueros de pacientes con AR y AT reconocen un importante número de proteínas citrulinadas en comparación con las proteínas nativas. (Fig. 7.9)



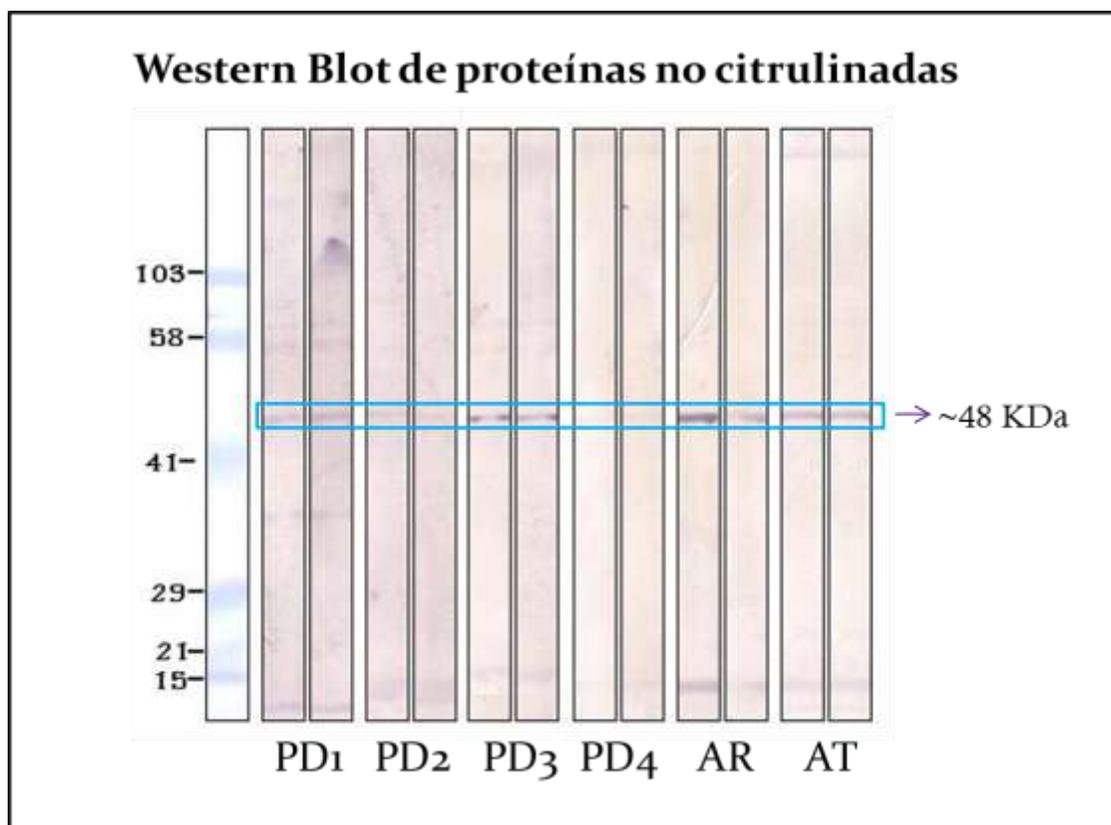
**Figura 7.9** Reactividad de los plasmas de donadores sanos y pacientes con AT y AR contra proteínas citrulinadas.

Es posible apreciar que la banda de ~48 kDa es reconocida por los cuatro plasmas de donadores sanos así como por los sueros de pacientes. Las PC de ~14 kDa, ~35 kDa y ~104 kDa sólo son reconocidas por el plasma 2 y los sueros de pacientes. La proteína citrulinada ~52 kDa sólo es reconocida por el plasma 1 y 2 y los sueros de pacientes. Cabe recordar que la vimentina citrulinada tiene un peso molecular de 52 kDa, esta proteína se ha identificado en pacientes con AR y AT y se ha asociado con un fenotipo más agresivo de la enfermedad y de peor pronóstico

[83]. En un trabajo previo de nuestro laboratorio se identificaron y caracterizaron las bandas de ~48 kDa que fueron reconocidas por el 54% de los pacientes con AT [84].

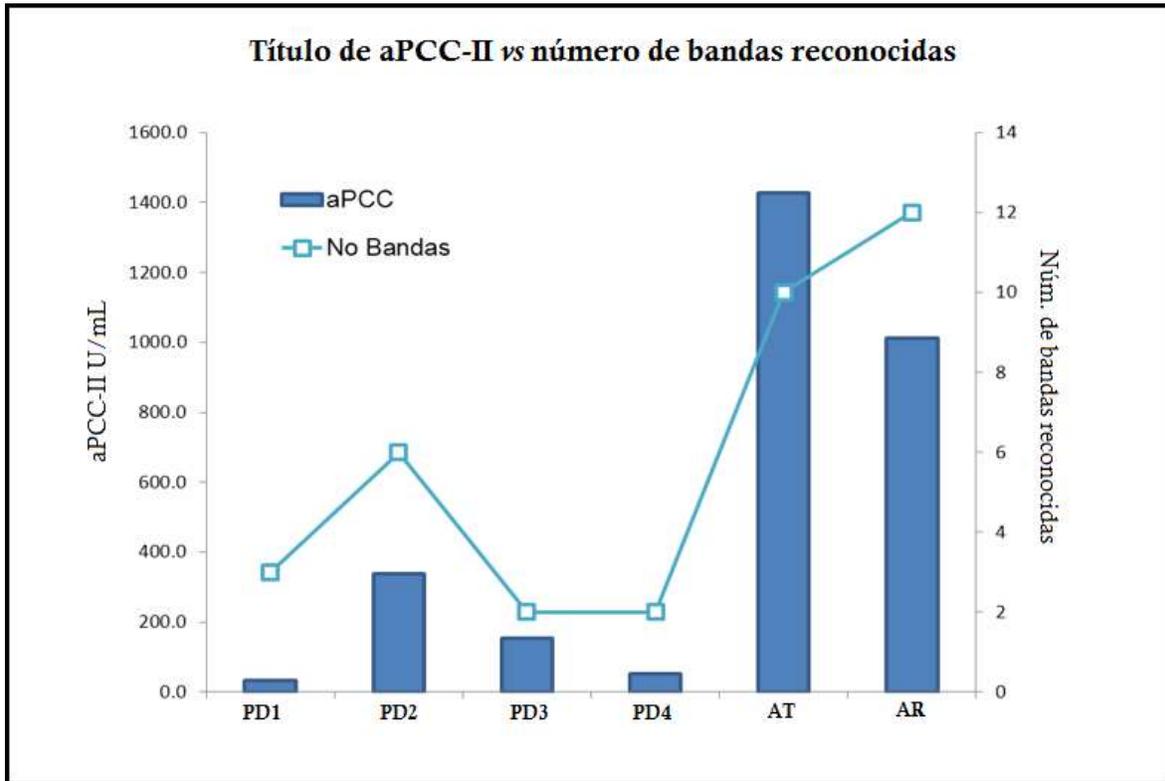
La secuenciación de la banda permitió identificarla como enolasa- $\alpha$ , una proteína cuyo reconocimiento por los APCA ha sido asociada con AR por su valor diagnóstico y pronóstico [33, 85, 86].

Es importante señalar que existen proteínas que son reconocidas sólo en su forma no citrulinada por los plasmas de donadores sanos y sueros de pacientes y dejan de ser reconocidas en su forma citrulinada (**Fig. 7.10**)



**Figura 7.10** Reactividad de los plasmas de donadores sanos y pacientes con AT y AR contra proteínas citrulinadas.

Finalmente se realizó un análisis entre el número de bandas citrulinadas reconocidas por los PDS y sueros de AT y AR con su título de aPCC-II. (**Fig 7.11**)



**Figura 7.11** Análisis del número de bandas citrulinadas reconocidas por los aPCC y su correlación con el título de aPCC-II.

Al igual que en estudios previos, se demuestra que a un mayor título de aPCC, la diversidad de APCA incrementa. Entonces la reactividad de los aPCC no está dirigida contra un sólo epítipo citrulinado, por el contrario, entre mayor título de aPCC se tenga es mayor el número de proteínas citrulinadas reconocidas [87, 88].

## 8. DISCUSIÓN

---

Recientemente, el estudio de los APCA ha adquirido gran interés debido a su alta especificidad, (99.5%) en pacientes con AR [45], y más allá de su valor diagnóstico y pronóstico, el interés de estos anticuerpos radica en su participación en la patogénesis de la enfermedad [50, 56, 89].

Sin embargo, son pocos los estudios realizados en sujetos sanos que analizan este tipo de autoanticuerpos, en su mayoría se tratan de estudios retrospectivos donde se analizan muestras de pacientes con AR antes del desarrollo de la enfermedad [45]. Estos trabajos han demostrado que la presencia de APCA antecede la aparición de la AR.

El presente trabajo, es el primero en donde se determina la prevalencia de los aPCC presentes en plasmas de donadores sanos y se analizan sus características inmunoquímicas y su comparación con los aPCC presentes en pacientes con AT y AR de larga evolución. La prevalencia de estos anticuerpos podría considerarse alta tratándose de una población clínicamente sana y sin antecedentes heredofamiliares de enfermedad autoinmune. Se ha demostrado que el tabaquismo es un factor de riesgo ambiental que se asocia tanto a la presencia de los APCA [21, 90] así como al desarrollo de AR [19, 20] y aunque en el formato de donación se cuestiona sobre frecuencia de tabaquismo, no fue posible determinar la influencia del mismo en los resultados de los donadores con APCA positivos.

La prueba de aPCC es una herramienta diagnóstica utilizada para detectar APCA [37]. La diversidad antigénica de los péptidos citrulinados incluidos en cada prueba ya sea aPCC-II o aPCC-III, puede ser limitada. Actualmente no se han descrito todos los antígenos citrulinados

posibles de ser reconocidos por los APCA. No obstante, por los valores de sensibilidad y especificidad tanto para AT como para AR es una prueba que ha sido incluida dentro de los criterios de clasificación del CAR en 2010 [15].

Los estudios en donde se ha analizado la reactividad de los APCA antes del desarrollo de AR, destacan que la importancia de identificar el antígeno reconocido por los APCA (péptido inmunodominante), es superada cuando se analiza el número y la diversidad de los antígenos citrulinados reconocidos [87, 88], demostrando que antes del diagnóstico de la enfermedad se incrementa la diversidad de los antígenos reconocidos por los APCA, y no sólo la concentración de los autoanticuerpos.

Los estudios en donde se ha buscado la utilidad diagnóstica de la prueba de aPCC para el diagnóstico de AR y pronóstico de la enfermedad (en términos de actividad y daño radiológico) son estudios clínicos longitudinales, donde se tiene conocimiento y control de las variables sociodemográficas y clínicas de los sujetos con AR y de la población sana a estudiar.

Nuestro estudio, fue transversal y completamente observacional, en donde las muestras de plasma fueron obtenidas del banco de sangre del INC seleccionadas aleatoriamente y los sueros de pacientes con AR (n=5) y AT (n=3) fueron seleccionados del banco de sueros de la clínica de AR del INCMNSZ, cuyo criterio de inclusión en el trabajo fueron títulos de aPCC > 500 U/mL. Por el número limitado de pacientes, no fue posible determinar valores de especificidad y sensibilidad además de no ser parte de los objetivos de este trabajo. Por otra parte, en la población mestiza mexicana ya han sido establecidos previamente estos valores en nuestro laboratorio y son muy similares a los encontrados en los estudios en poblaciones caucásicas[91].

A pesar de que la positividad combinada de los anticuerpos aPCC y FR predice con una media de 2.5 años previos el desarrollo de síntomas y manifestaciones clínicas de la AR [37], la determinación individual de aPCC tiene un valor predictivo positivo de 96% y una razón de riesgo

de padecer AR mayor que el FR. Sin embargo, aún con esta evidencia tan contundente, no es posible asegurar que un individuo clínicamente sano con aPCC positivos desarrollará síntomas de AR. No sólo el hábito de fumar es desencadenante de citrulinación masiva de proteínas citrulinadas, la exposición a otros contaminantes puede causar daño al tejido pulmonar, liberación de PAD, aumentando la citrulinación indiscriminada de proteínas liberadas por el daño y lo que en individuos genéticamente susceptibles incrementaría el riesgo de desarrollar autoinmunidad [24].

La utilidad de la detección de anti-VMC como herramienta de diagnóstico y pronóstico de AR ha sido estudiada recientemente y se han asociado con una enfermedad más agresiva [83]. Sin embargo, no todos los pacientes aPCC positivos deben necesariamente de tener reactividad contra vimentina citrulinada [83].

El PD4 fue el que mostró la menor reactividad contra VMC (21.73, VR=20 U/mL), el cual es muy cercano al valor de corte, pero con título positivo medio de aPCC = 52.2 U/mL. Se comprobó la ausencia de reactividad contra la proteína de 52 kDa, peso similar a la vimentina citrulinada, pero hubo reconocimiento de otras proteínas citrulinadas como la banda de 48 kDa, similar al peso de la enolasa- $\alpha$ .

La presencia de factor reumatoide positivo tiene una razón de riesgo para el desarrollo de artritis reumatoide OR=2.3 (IC95% 1.2-4.2). Es de destacar que el FR-IgM fue negativo en los cuatro plasmas. En estudios realizados por van de Stadt y cols. en 2011, se demuestra que la aparición del FR-IgM es más cercana al desarrollo de AR. Los mismos autores lo postulan como el evento decisivo y determinante para el desarrollo de la enfermedad. Estos hallazgos, junto con la combinación de otros factores como el efecto en la glicosilación del FR-IgM [92, 93] justificarían el por qué no todos los individuos APCA positivos desarrollan AR.

En este nuevo ensayo se demuestra que los aPCC de isotipo IgG tienen una distribución de subclases similar a lo encontrados en los pacientes con AR reportado por Verpoort et al. [46] que analizaron la distribución de subclases de IgG de aPCC en un grupo de 152 pacientes con AR donde el 99% fue positivo para IgG1 y el 98% fue positivo para IgG4. En los plasmas de donadores sanos se observa la presencia mayoritaria de las subclases IgG1 e IgG4, sin embargo, de manera sorprendente, sólo un plasma presentó incremento únicamente en la cantidad de subclase IgG3. Cuando se comparó la distribución de subclase de IgG con los pacientes con AT y AR, se observó que los pacientes con AT mostraron incremento de IgG1 e IgG4 con respecto a los plasmas de donadores sanos aunque a títulos superiores. Las muestras de AR presentaron una mayor concentración de todas las subclases de IgG con respecto a los plasmas de donadores sanos y a AT y también presentaron en su mayoría IgG1 e IgG4.

Recientemente van de Stadt et al, demostraron que la subclase IgG4 está presente en 1% de sujetos sanos, 3.8% de donadores pre-AR, 13% de pacientes con artralgiyas y 19% AT y 16% de AR establecida y proponen a la IgG4 como un factor importante en el mecanismo de inflamación mediado por APCA [94].

Los APCA de PDS detectados como aPCC fueron capaces de reconocer proteínas citrulinadas que también son reconocidas por los pacientes con AR y AT. La detección temprana de estos autoanticuerpos podría indicar un proceso de pérdida de la tolerancia hacia proteínas citrulinadas en estos donadores y el significado biológico de este fenómeno será de gran interés para futuras investigaciones.

En este estudio la diversidad de los APCA de PDS fue limitada. Un seguimiento a estos donadores de manera longitudinal podría aportar información sobre los factores inmunológicos y ambientales que pueden provocar tanto la aparición del FR como el incremento de la diversidad

del reconocimiento de proteínas citrulinadas, con el objetivo de prevenir las manifestaciones clínicas de la artritis reumatoide.

Por otro lado, la presencia de APCA en sujetos sanos habla de una baja especificidad de la prueba de aPCC, pues su aparición ocurre en sujetos considerados clínicamente sanos. Tomando en cuenta que los péptidos cíclicos citrulinados no están presentes en organismos biológicos, el objetivo principal de los estudios recientes se basa en identificar cuáles proteínas o péptidos de proteínas individuales (ya sea colágeno, fibrinógeno, vimentina, alfa-enolasa, etc.) o como grupo, pueden ser de interés tanto para el diagnóstico como para el pronóstico y seguimiento de los pacientes.

Aunque la presencia de APCA en estos cuatro donadores sanos sugiere que en un futuro podrían desarrollar manifestaciones clínicas de AR, no existe evidencia contundente que permita asegurar que así ocurra.

## 9. CONCLUSIONES

---

En este estudio se determinó la prevalencia de aPCC en sujetos sanos mexicanos, la cual es menor a la reportada en otros estudios con poblaciones de origen caucásico.

El análisis de distribución de subclases de IgG demostró que existe una similitud entre los plasmas de los donadores aPCC (+) y los sueros con AR y AT aPCC (+).

Se aporta evidencia de que los plasmas de donadores sanos con aPCC positivos reconocen proteínas citrulinadas que también son reconocidas por los sueros de pacientes con AT y AR, por lo que los aPCC encontrados en los plasmas de donadores sanos tienen características inmunoquímicas similares a los encontrados en los pacientes con AT y AR.

# 10. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Aceves-Avila, F.J., et al., *Paleopathology in osseous remains from the 16th century. A survey of rheumatic diseases*. J Rheumatol, 1998. **25**(4): p. 776-82.
2. Rothschild, B.M., K.R. Turner, and M.A. DeLuca, *Symmetrical erosive peripheral polyarthritis in the Late Archaic Period of Alabama*. Science, 1988. **241**(4872): p. 1498-501.
3. Firestein, G.S., *Evolving concepts of rheumatoid arthritis*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 356-61.
4. Morrow, J.I., D., *Autoimmune rheumatic disease*. 2 ed, ed. O.M. Publications. 1999, Oxford, EN: Oxford University Press, Incorporated. 288.
5. Franklin, E.C., et al., *An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis*. J Exp Med, 1957. **105**(5): p. 425-38.
6. Zvaifler, N.J., *The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis*. Adv Immunol, 1973. **16**(0): p. 265-336.
7. Stastny, P., *Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis*. J Clin Invest, 1976. **57**(5): p. 1148-57.
8. Orozco, G., B. Rueda, and J. Martin, *Genetic basis of rheumatoid arthritis*. Biomed Pharmacother, 2006. **60**(10): p. 656-62.
9. Strand, V., R. Kimberly, and J.D. Isaacs, *Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(1): p. 75-92.
10. Lee, D. and M. Weinblatt, *Rheumatoid arthritis*. The Lancet, 2001. **358**(9285): p. 903-911.
11. EP., G., *Artritis reumatoide. Manifestaciones clínicas articulares.*, in *Tratado de Reumatología*, R.V.V. Gomez EP, Carbonel Abello J, Gomez-Reino Carnota J. , Editor. 1998, Arán Ediciones SA: Madrid. p. 493-50.
12. March, L. and H. Lapsley, *What are the costs to society and the potential benefits from the effective management of early rheumatoid arthritis?* Best Pract Res Clin Rheumatol, 2001. **15**(1): p. 171-85.
13. Alamanos, Y., P.V. Voulgari, and A.A. Drosos, *Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review*. Semin Arthritis Rheum, 2006. **36**(3): p. 182-8.
14. Arnett, F.C., et al., *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1988. **31**(3): p. 315-24.
15. Aletaha, D., et al., *2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(9): p. 2569-81.
16. Wolfe, F., et al., *Consensus recommendations for the assessment and treatment of rheumatoid arthritis*. J Rheumatol, 2001. **28**(6): p. 1423-30.
17. O'Dell, J.R., *Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 2004. **350**(25): p. 2591-602.
18. Rioux, J.D. and A.K. Abbas, *Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 584-9.
19. Karlson, E.W., et al., *A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(5): p. 910-7.
20. Silman, A.J., J. Newman, and A.J. MacGregor, *Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins*. Arthritis Rheum, 1996. **39**(5): p. 732-5.

21. Stolt, P., et al., *Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases.* Ann Rheum Dis, 2003. **62**(9): p. 835-41.
22. Stolt, P., et al., *Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study.* Ann Rheum Dis, 2005. **64**(4): p. 582-6.
23. Sverdrup, B., et al., *Association between occupational exposure to mineral oil and rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA case-control study.* Arthritis Res Ther, 2005. **7**(6): p. R1296-303.
24. Klareskog, L., et al., *Mechanisms of disease: Genetic susceptibility and environmental triggers in the development of rheumatoid arthritis.* Nat Clin Pract Rheumatol, 2006. **2**(8): p. 425-33.
25. Hazes, J.M., et al., *Reduction of the risk of rheumatoid arthritis among women who take oral contraceptives.* Arthritis Rheum, 1990. **33**(2): p. 173-9.
26. MacGregor, A.J., et al., *Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins.* Arthritis Rheum, 2000. **43**(1): p. 30-7.
27. Huizinga, T.W., et al., *Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins.* Arthritis Rheum, 2005. **52**(11): p. 3433-8.
28. Imboden, J.B., *The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis.* Annu Rev Pathol, 2009. **4**: p. 417-34.
29. du Montcel, S.T., et al., *New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility.* Arthritis Rheum, 2005. **52**(4): p. 1063-8.
30. Bridges, S.L., Jr., J.M. Kelley, and L.B. Hughes, *The HLA-DRB1 shared epitope in Caucasians with rheumatoid arthritis: a lesson learned from tic-tac-toe.* Arthritis Rheum, 2008. **58**(5): p. 1211-5.
31. Michou, L., et al., *Validation of the reshaped shared epitope HLA-DRB1 classification in rheumatoid arthritis.* Arthritis Res Ther, 2006. **8**(3): p. R79.
32. Morgan, A.W., et al., *The shared epitope hypothesis in rheumatoid arthritis: evaluation of alternative classification criteria in a large UK Caucasian cohort.* Arthritis Rheum, 2008. **58**(5): p. 1275-83.
33. Lundberg, K., et al., *Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity.* Arthritis Res Ther, 2005. **7**(3): p. R458-67.
34. Sebbag, M., et al., *The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies.* J Clin Invest, 1995. **95**(6): p. 2672-9.
35. Vossenaar, E.R., et al., *Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin.* Arthritis Res Ther, 2004. **6**(2): p. R142-50.
36. van Gaalen, F.A., et al., *Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study.* Arthritis Rheum, 2004. **50**(3): p. 709-15.
37. Schellekens, G.A., et al., *The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide.* Arthritis Rheum, 2000. **43**(1): p. 155-63.
38. Kroot, E.J., et al., *The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis.* Arthritis Rheum, 2000. **43**(8): p. 1831-5.
39. Nienhuis, R.L. and E. Mandema, *A NEW SERUM FACTOR IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS; THE ANTIPERINUCLEAR FACTOR.* Ann Rheum Dis, 1964. **23**: p. 302-5.
40. Young, B.J., et al., *Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis.* Br Med J, 1979. **2**(6182): p. 97-9.
41. Girbal-Neuhauser, E., et al., *The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues.* J Immunol, 1999. **162**(1): p. 585-94.

42. Schellekens, G.A., et al., *Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies*. J Clin Invest, 1998. **101**(1): p. 273-81.
43. Masson-Bessiere, C., et al., *The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 4177-84.
44. Vencovsky, J., et al., *Autoantibodies can be prognostic markers of an erosive disease in early rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(5): p. 427-30.
45. Nielen, M.M., et al., *Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(2): p. 380-6.
46. Verpoort, K.N., et al., *Isotype distribution of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis reflects an ongoing immune response*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(12): p. 3799-808.
47. Ioan-Facsinay, A., et al., *Marked differences in fine specificity and isotype usage of the anti-citrullinated protein antibody in health and disease*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(10): p. 3000-8.
48. Vossenaar, E.R., et al., *The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(11): p. 3485-94.
49. Berglin, E., et al., *Radiological outcome in rheumatoid arthritis is predicted by presence of antibodies against cyclic citrullinated peptide before and at disease onset, and by IgA-RF at disease onset*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(4): p. 453-8.
50. Kuhn, K.A., et al., *Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis*. J Clin Invest, 2006. **116**(4): p. 961-73.
51. Klareskog, L., et al., *Immunity to Citrullinated Proteins in Rheumatoid Arthritis*. Annual Review of Immunology, 2008. **26**(1): p. 651-675.
52. Clavel, C., et al., *Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fc gamma receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(3): p. 678-88.
53. Sokolove, J., et al., *Immune complexes containing citrullinated fibrinogen costimulate macrophages via Toll-like receptor 4 and Fc gamma receptor*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(1): p. 53-62.
54. Zhao, X., et al., *Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2008. **10**(4): p. R94.
55. van Oosterhout, M., et al., *Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(1): p. 53-60.
56. Trouw, L.A., et al., *Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(7): p. 1923-31.
57. Gyorgy, B., et al., *Citrullination: a posttranslational modification in health and disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(10): p. 1662-77.
58. van Venrooij, W.J. and G.J. Pruijn, *Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis*. Arthritis Res, 2000. **2**(4): p. 249-51.
59. Chavanas, S., et al., *Peptidylarginine deiminases and deimination in biology and pathology: Relevance to skin homeostasis*. Journal of Dermatological Science, 2006. **44**(2): p. 63-72.
60. Chavanas, S., et al., *Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segments and a new human gene, PADI6*. Gene, 2004. **330**(0): p. 19-27.
61. Arita, K., et al., *Structural basis for Ca(2+)-induced activation of human PAD4*. Nat Struct Mol Biol, 2004. **11**(8): p. 777-83.
62. Mechin, M.C., et al., *The peptidylarginine deiminases expressed in human epidermis differ in their substrate specificities and subcellular locations*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(17): p. 1984-95.
63. Inagaki, M., et al., *Ca<sup>2+</sup>-dependent deimination-induced disassembly of intermediate filaments involves specific modification of the amino-terminal head domain*. J Biol Chem, 1989. **264**(30): p. 18119-27.

64. Wang, Y., et al., *Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethyliminination*. Science, 2004. **306**(5694): p. 279-83.
65. Takahara, H., et al., *Expression of peptidylarginine deiminase in the uterine epithelial cells of mouse is dependent on estrogen*. J Biol Chem, 1992. **267**(1): p. 520-5.
66. Tarcsa, E., et al., *Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin*. J Biol Chem, 1996. **271**(48): p. 30709-16.
67. Vossenaar, E.R., et al., *PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease*. Bioessays, 2003. **25**(11): p. 1106-18.
68. Suzuki, A., et al., *Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis*. Nat Genet, 2003. **34**(4): p. 395-402.
69. Barton, A., et al., *A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population is not associated in a United Kingdom population*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(4): p. 1117-21.
70. Caponi, L., et al., *A family based study shows no association between rheumatoid arthritis and the PADI4 gene in a white French population*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(4): p. 587-93.
71. Martinez, A., et al., *PADI4 polymorphisms are not associated with rheumatoid arthritis in the Spanish population*. Rheumatology (Oxford), 2005. **44**(10): p. 1263-6.
72. Kang, C.P., et al., *A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(1): p. 90-6.
73. Burkhardt, H., et al., *Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis*. Eur J Immunol, 2005. **35**(5): p. 1643-52.
74. Cook, A.D., et al., *Antibodies against the CB10 fragment of type II collagen in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2004. **6**(5): p. R477-83.
75. Suzuki, A., et al., *Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **333**(2): p. 418-26.
76. M., M., *Human Immunoglobulin Isotyping Kit Cat. No. HGAM-301 Directional Insert*. 2009, Millipore Inc.
77. Boire, G., et al., *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**(3): p. R592-603.
78. Vossenaar, E.R. and W.J. van Venrooij, *Citrullinated proteins: sparks that may ignite the fire in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2004. **6**(3): p. 107-11.
79. Feitsma, A.L., et al., *Identification of citrullinated vimentin peptides as T cell epitopes in HLA-DR4-positive patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(1): p. 117-25.
80. van Gaalen, F., et al., *The devil in the details: the emerging role of anticitrulline autoimmunity in rheumatoid arthritis*. J Immunol, 2005. **175**(9): p. 5575-80.
81. MILLIPLEX, M., *Human Immunoglobulin Isotyping Kit Cat. No. HGAM-301. Directional Insert*, C. Millipore®, Editor. 2009.
82. Swart, A., et al., *Third generation anti-citrullinated peptide antibody assay is a sensitive marker in rheumatoid factor negative rheumatoid arthritis*. Clin Chim Acta, 2012. **414**: p. 266-72.
83. Mathsson, L., et al., *Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(1): p. 36-45.
84. Olivares-Martínez, E., *Identificación de los epítomos reconocidos por los anticuerpos anti-peptidos citrulinados presentes en los pacientes con artritis temprana*, in *Posgrado en Ciencias Biológicas. Facultad de Medicina, UNAM*. 2008, Universidad Nacional Autónoma de México: México, D.F. p. 75.
85. Kinloch, A.J., et al., *Immunization with Porphyromonas gingivalis enolase induces autoimmunity to mammalian alpha-enolase and arthritis in DR4-IE-transgenic mice*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(12): p. 3818-23.

86. Saulot, V., et al., *Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme alpha-enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2002. **46**(5): p. 1196-201.
87. van de Stadt, L.A., et al., *The extent of the anti-citrullinated protein antibody repertoire is associated with arthritis development in patients with seropositive arthralgia*. *Ann Rheum Dis*, 2011. **70**(1): p. 128-33.
88. van de Stadt, L.A., et al., *Development of the anti-citrullinated protein antibody repertoire prior to the onset of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2011. **63**(11): p. 3226-33.
89. Snir, O., et al., *Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients*. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(1): p. 44-52.
90. Klareskog, L., et al., *A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(1): p. 38-46.
91. Olivares-Martínez, E., *Utilidad de los anticuerpos Anti-péptidos cíclicos citrulinados y del Factor Reumatoide IgAGM en l diagnóstico de pacientes con AT*, in *Facultad de Química, UNAM*. 2005, Universidad Nacional Autónoma de México: México, D.F. p. 51.
92. Ercan, A., et al., *Aberrant IgG galactosylation precedes disease onset, correlates with disease activity, and is prevalent in autoantibodies in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(8): p. 2239-48.
93. Scherer, H.U., et al., *Glycan profiling of anti-citrullinated protein antibodies isolated from human serum and synovial fluid*. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(6): p. 1620-9.
94. van de Stadt, L.A., et al., *Antibodies to IgG4 hinge can be found in rheumatoid arthritis patients during all stages of disease and may exacerbate chronic antibody-mediated inflammation*. *Arthritis Rheumatol*, 2014. **66**(5): p. 1133-40.
95. Lundberg, K., et al., *Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase*. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(10): p. 3009-19.

# 11. ABREVIATURAS

---

<b>AIC</b>	Artritis inducida por colágeno
<b>AKA</b>	Anticuerpos anti-keratina
<b>AP</b>	Fosfatasa alcalina
<b>APCA</b>	Anticuerpos anti proteínas citrulinadas
<b>aPCC-II</b>	Anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados de segunda generación.
<b>aPCC-III</b>	Anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados de tercera generación.
<b>APF</b>	Anticuerpos anti-factor perinuclear
<b>AR</b>	Artritis reumatoide
<b>AT</b>	Artritis temprana, menor a dos años de evolución.
<b>aVMC</b>	Anticuerpos anti-vimentina mutada citrulinada
<b>CAR</b>	Colegio Americano de Reumatología
<b>CIC</b>	Complejos inmunes circulantes
<b>CNBr</b>	Bromuro de cianógeno
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>EC</b>	Epítipo compartido
<b>EIT</b>	Electroinmunotransferencia
<b>ELISA</b>	Acrónimo del inglés “ <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> ”. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.
<b>EMTC</b>	Enfermedad mixta de tejido conectivo
<b>FR</b>	Factor reumatoide
<b>hC-I</b>	Colágeno humano tipo 1
<b>hC-II</b>	Colágeno humano tipo 2
<b>HEp-2</b>	Línea celular de carcinoma epitelial humano.
<b>HLA</b>	Acrónimo del inglés “ <i>Human Leucocyte Antigen</i> ”. Antígeno leucocitario humano
<b>HRP</b>	Acrónimo del inglés “ <i>Horseradish peroxidase</i> ”. Peroxidasa de rábano.
<b>INC</b>	Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

<b>INCMNSZ</b>	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”
<b>LEG</b>	Lupus eritematoso generalizado.
<b>MHC</b>	Acrónimo del inglés “ <i>Major histocompatibility complex</i> ”. Complejo principal de histocompatibilidad.
<b>PAD</b>	Peptidil-arginina-deiminasa
<b>PCR</b>	Proteína C reactiva.
<b>PDS</b>	Plasmas de donadores sanos.
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.
<b>SNPs</b>	Acrónimo del inglés “ <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ”. Polimorfismo de un solo nucleótido
<b>SSP</b>	Síndrome de Sjögren primario
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TLR</b>	Acrónimo del inglés “ <i>Toll-like receptor</i> ”. Receptor tipo Toll.
<b>TMB</b>	Tetra- <i>metil</i> -bencidina.
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa.
<b>VSG</b>	Velocidad de sedimentación globular.