



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Facultad
de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

**Evaluación de la inmunorreactividad del péptido
citrulinado PTFGcitSFTLASSET en una cohorte de
pacientes con artritis reumatoide y desarrollo
preliminar de suero hiperinmune**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN FARMACIA

PRESENTA

LF. ALMA ELOÍSA VARELA RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS

Dr. JOSÉ LUIS MONTIEL HERNÁNDEZ

CUERNAVACA, MORELOS

2023

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	6
ABREVIATURAS.....	9
GLOSARIO.....	12
1. RESUMEN.....	14
2. ABSTRACT	16
3. INTRODUCCIÓN	18
3.1 Artritis Reumatoide	18
3.1.1 Epidemiología	19
3.1.2 Etiología.....	19
3.1.3 Inmunopatogénesis	26
3.2 Modificaciones postraduccionales de proteínas	29
3.2.1 Citrulinación	29
3.2.2 Impacto fisiológico de la Citrulinación.....	30
3.2.3 Hipercitrulinación	31
3.2.4 Citrulinoma.....	32
4. ANTECEDENTES	34
4.1 Anticuerpos de Diagnóstico.....	34
4.1.1 Factor Reumatoide	35
4.1.2 Anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico.....	35
4.1.3 Inmunorreactividad e inmunogenicidad de epítomos citrulinados de diversas proteínas.....	38
4.1.4 Suero hiperinmune.	45
5. JUSTIFICACIÓN	46
6. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	48
7. HIPOTESIS	49
8. OBJETIVOS	50
8.1 Objetivo General	50
8.2 Objetivos Específicos	50
9. MATERIAL Y MÉTODOS.....	51
9.1 Diseño del Estudio.....	51
9.2 Revisión Bibliográfica.	51
9.2.1 Selección de péptidos a evaluar	52
9.2.2 Síntesis de péptido citrulinado y no citrulinado.....	53
9.3 Panel de plasma de pacientes a evaluar.....	54

9.3.1	Evaluación de inmunorreactividad por péptidos citrulinados.....	55
9.4	Animales para inmunización.....	59
9.4.1	Preparación de Antígeno con Adyuvante completo de Freund y Adyuvante incompleto de Freund.....	59
9.4.2	Inmunización con el péptido.....	60
9.4.3	Obtención de suero preinmune para monitoreo y sangrado a blanco.....	61
9.5	Estandarización ELISA indirecta para medir antisuero de ratón reactivo al péptido citrulinado.....	61
9.6	Evaluación de líquido sinovial de pacientes.....	62
9.7	Análisis por SDS-PAGE y western blot.....	63
9.8	Análisis de datos y estadístico.....	63
10.	RESULTADOS.....	65
10.1	Revisión bibliográfica y selección de los péptidos a evaluar.....	65
10.2	Descripción de panel de plasma de pacientes para evaluación.....	67
10.3	Inmunorreactividad péptidos contra plasma de pacientes.....	69
10.4	Relación entre variables clínicas e inmunorreactividad.....	71
10.5	Inmunización de ratones.....	73
10.6	Panel de muestras de líquido sinovial.....	75
10.7	Identificación de proteínas de líquido sinovial contra suero de ratón.....	75
11.	DISCUSIÓN.....	79
11.1	Antigenicidad del péptido citrulinado HCgp-39 (263-275) derivado de la proteína sinovial de 39 kDa.....	79
11.2	Suero hiperinmune.....	82
12.	LIMITACIONES.....	84
13.	CONCLUSIONES.....	86
14.	PERSPECTIVAS.....	87
15.	BIBLIOGRAFIA.....	889
16.	ANEXOS.....	98
	ANEXO 1. Ilustración de la expresión de proteínas específicas de órganos de las isoenzimas de peptidilarginina deiminasa (PAD) en humanos.....	98
	ANEXO 2. Secuencia total de aminoácidos de la proteína HC-gp39.....	99
	ANEXO 3. Características bioquímicas de las proteínas y de las secuencias a sintetizar.....	100
	ANEXO 4. Características en común de secuencias revisadas en publicaciones originales.....	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Protocolo de inmunización con péptido citrulinado.	60
Tabla 2. Listado de Secuencias de péptidos candidatos.....	66
Tabla 3. Datos demográficos, serológicos y farmacológicos de pacientes con AR.....	67
Tabla 4. Comparación entre pacientes en base a inmunorreactividad al péptido.	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica del bolsillo de unión de péptidos P4 de las moléculas (HLA-DR SE) asociadas con la AR.....	21
Figura 2. Posible papel de la PAD en la citrulinación de proteínas	23
Figura 3. Desarrollo hipotético de la artritis reumatoide.....	25
Figura 4. La cascada inflamatoria en la AR establecida..	28
Figura 5. Citrulinación normal y desregulada en la artritis reumatoide.	32
Figura 6. Diagrama de flujo de la búsqueda sistemática de información científica de péptidos citrulinados y su cotización para síntesis.....	52
Figura 7. Estandarización inicial de las condiciones del ELISA para inmunorreactividad péptido citrulinado.	57
Figura 8. Comparación entre condiciones modificadas: Sol. bloqueo (BSA 1.5%, leche descremada 5%) contra condiciones basales.	58
Figura 9. Inmunorreactividad comparativa entre péptido citrulinado y control (Arg) por ensayo de ELISA indirecto en plasmas de pacientes.....	70
Figura 10. Niveles de reactividad del péptido Citrulinado HC-gp 39 en suero de ratones BALB/c.....	74
Figura 11. Niveles de reactividad del péptido control (Arg) en suero de ratones BALB/c..	75
Figura 12. SDS/PAGE 15%, análisis de líquidos sinoviales (dil. 1:50), tinción con azul de Coomasie.....	76
Figura 13. SDS/PAGE 15%, análisis de líquidos sinoviales (dil. 1:50), tinción de plata. ...	77
Figura 14. Ensayo de Western Blot, con muestra de Líquido Sinovial de paciente 36.	78

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia por su apoyo inquebrantable y su paciencia durante este viaje académico. Su amor, comprensión y palabras de aliento constante han sido la fuerza que me impulsó a seguir adelante en los momentos desafiantes.

A mis padres por todos sus consejos; a mi hermano que siempre me ha inspirado para seguir adelante y a ayudarme a no dejar de creer en mí y a enseñarme a no rendirme ante los obstáculos.

Gracias a todos mis profesores que a lo largo de mi estancia en el posgrado de Maestría en Farmacia me hicieron abrir mis horizontes, apreciar lo hermoso que es la ciencia, ver el mundo con otra visión y romper mis viejos paradigmas.

A mis asesores de tesis, Dr. José Luis Montiel y la Doctora y directora de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Judith González Christen, les agradezco por la enorme oportunidad que me brindaron de redescubrir el mundo de la ciencia con su orientación, sabiduría, paciencia y dedicación incansable. Su experiencia y consejos fueron fundamentales para dar forma a esta investigación. Estoy agradecida por la confianza que depositaron en mí y por brindarme la oportunidad de aprender de ustedes.

Además, quiero extender mi sincero agradecimiento al Dr. Fernando Esquivel por brindarme su tiempo para llevar a cabo la manipulación de ratones y por trabajar en el laboratorio 1 de virología de la Facultad de Medicina UAEM, además por permitirme trabajar en el Bioterio de la Facultad de Medicina UAEM y a la Dra. Vanesa por orientarme en el uso de los ratones.

También quiero expresar mi gratitud a los miembros del jurado que me brindaron de su tiempo, expertise y participación para continuar con las correcciones finas de mi tesis. A la Dra. Deshiré Alpízar Rodríguez, quien con sus preguntas perspicaces y su experiencia en el campo ha sido un estímulo para profundizar en mi

investigación.

Al Dr. Fernando Esquivel, quien también contribuyó de manera invaluable para este trabajo de investigación, además le agradezco por su aporte valioso y su perspectiva única, que enriqueció significativamente mi trabajo.

Aprecio sinceramente el tiempo y esfuerzo que dedicó la Dra. Diana Gómez Galicia, por a las observaciones puntuales de la tesis y su disponibilidad en cualquier momento.

En conjunto agradezco la retroalimentación brinda por todos los miembros del jurado que ha sido crucial para perfeccionar mi investigación, ya que también han contribuido al crecimiento de mis habilidades académicas, desde luego estoy profundamente agradecida por su dedicación a la excelencia académica.

También quiero agradecer a mis compañeros del Laboratorio 13 de la Facultad de Farmacia, que compartieron conmigo sus conocimientos, tiempo y anécdotas durante este trayecto. Además, quiero reconocer a Mariana y Karina, mis compañeras del Laboratorio 1 de Virología de la Facultad de Medicina UAEM, quienes me brindaron apoyo adicional y estuvieron siempre disponibles para orientarme y para ayudarme a obtener muestra de los ratones.

Por último, agradezco al personal de control escolar de la Facultad de Farmacia que estuvieron para apoyarme durante toda mi estancia en la Facultad, incluso remotamente y de igual manera agradezco al apoyo económico de CONACyT que hizo posible mi formación académica y desde luego llevar a cabo la realización de este proyecto al brindarme la beca con número (792628), con número de CVU 1099946.

Este logro es el resultado de un esfuerzo colectivo y la culminación de años de trabajo y dedicación. A cada persona mencionada y a todas las demás que de alguna manera contribuyeron a este proyecto, les estoy enteramente agradecida.

¡Gracias!

L.F Alma Eloísa Varela Ramírez

Laboratorio 13 de citocinas y autoinmunidad.

Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

2023

ABREVIATURAS

AR	Artritis reumatoide
Arg	Arginina
AFC	Adyuvante Completo de Freund
AcM	Anticuerpo monoclonal
ACPA/a-CCP	Anticuerpos anti-péptido citrulinado/ Anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AKA	Anticuerpos anti queratina citrulinada
AFA	Anticuerpos anti filagrina citrulinada
ACR	Colegio Americano de Reumatología
anti-CEP1	Anticuerpos anti proteína estructural de las células (tubulina épsilon citosólica)
antiMCV	Anticuerpos anti vimentina mutada citrulinada.
anti-Sa	Anticuerpos anti proteína nuclear "scl-70"
BCR	Receptor linfocito B
BSA	Albumina sérica bovina
Ca+	Calcio
Cit	Citrulina
CII	Colágeno tipo II
CIA	Artritis inducida por colágeno
CD	Célula dendrítica
CDAI	Índice clínico de actividad de la enfermedad
COPCORD	Programa Orientado a la Comunidad para el Control de las Enfermedades Reumáticas
CPA	Célula presentadora de antígeno
DAMPs	Marcadores moleculares asociados a daño
DAS28	Puntuación de actividad de la enfermedad sobre 28 articulaciones
DO	Densidad óptica
DE	Desviación estándar

EC	Epítopo compartido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas
EULAR	Liga Europea contra el Reumatismo
IC	Intervalo de confianza
IFA	Adyuvante Incompleto de Freund
Ig/IgM, IgG	Inmunoglobulina/Inmunoglobulina M, G
IL	Interleucina
Fc	Fracción cristalizable
FcR	Receptor para Fc
FR	Factor reumatoide
GC	Glucocorticoides
hFibA	Fibrinógeno anti citrulinado
HC-gp 39	Glicoproteína del cartílago humano 39
HLA-II	Antígeno Leucocitario Humano clase II
HRP	Enzima peroxidasa de rábano picante
IMC	Índice de masa corporal
INFγ	Interferón gamma
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LES	Lupus eritematoso sistémico
LTH	Hipercitrulinación leucotóxica
L.S	Líquido sinovial
mM	Micro molar
MAC	Complejo de ataque a la membrana
MPT	Modificación postraducciona
MMPs	Metaloproteasas de matriz
MTX	Metrotexato
MHC	Complejo mayor de Histocompatibilidad
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido

NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NETs/Netosis	Trampas extracelulares de neutrófilos/Proceso biológico de la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos
NK	Natural killer
OR	Odds Ratio (razón de momios)
PAD	Peptidil Arginina Deiminasa
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Solución salina amortiguadora por fosfatos
PCR	Proteína C reactiva
PMSF	Fenilmetanosulfonil fluoruro
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
PTPN22	Gen que codifica la proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 22
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RU/mL	Unidades relativas por mililitro
SDAI	Índice simplificado de actividad de la enfermedad
SDS/PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio
TCR	Receptor linfocito T
TLR	Receptor tipo Toll
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
VSG	Velocidad de sedimentación globular
WB	Western blot

GLOSARIO

Citrulinoma: Conjunto de proteínas modificadas que pueden tener el papel de neo antígenos y permiten el reconocimiento por el sistema inmune adaptativo de un paciente. Es decir, son proteínas que pudieran ser blanco de los autoanticuerpos de los pacientes.

Especificidad analítica: Capacidad de distinguir entre el analito buscado y los componentes de la muestra.

Especificidad Diagnóstica: Capacidad de una prueba para descartar correctamente a las personas que no tiene la condición o enfermedad en estudio. Mide la proporción de personas sin la condición que son identificadas correctamente como negativas por la prueba. Una alta especificidad indica que la prueba tiene baja tasa de falsos positivos.

Epítopo: También conocido como “determinante antigénico”, pueden ser secuencias de aminoácidos y es una región específica de una molécula que es reconocida por receptores del sistema inmunológico o por los anticuerpos.

Falso positivo: Ocurre cuando un modelo o algoritmo indica que hay relación o patrón entre variables, pero en realidad no existe. Esto puede conducir a conclusiones erróneas o a la toma de decisiones basada en información incorrecta.

Inmunorreactividad: Es la capacidad de un anticuerpo para unirse o detectar específicamente a un antígeno y producir una respuesta inmunitaria.

Inmunogenicidad: Capacidad de un antígeno de inducir una respuesta inmunitaria en un organismo.

Neo antígeno: Es un tipo particular de antígeno que surge como resultado de modificaciones postraduccionales o mutaciones genéticas.

Péptido: Molécula compuesta por la unión de dos o más aminoácidos mediante enlaces peptídicos que resultan de la reacción química entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carboxilo de otro aminoácido.

Sensibilidad analítica: Límite inferior de detección de un analito en una prueba.

Sensibilidad Diagnóstica: Capacidad de una prueba para detectar correctamente a las personas que tienen la condición o enfermedad en estudio.

Tolerancia inmunológica: Capacidad del sistema inmunológico para reconocer y

tolerar los antígenos propios del organismo, evitando una respuesta inmunitaria excesiva o inapropiada contra ellos, además es un mecanismo esencial para mantener la homeóstasis y prevenir respuestas inmunitarias autoinmunes.

1. RESUMEN

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, crónica e inflamatoria. Se caracteriza por afectación poliarticular y puede presentar manifestaciones sistémicas. Sin un tratamiento adecuado puede progresar hasta el deterioro estructural propiciando discapacidad en el paciente. Adicionalmente, esta enfermedad se asocia con una serie de comorbilidades que disminuyen la calidad de vida del paciente e incrementa significativamente su riesgo de muerte.

Se reconoce que la etiología de la enfermedad es multifactorial donde coinciden factores tanto genéticos como no genéticos. Sin embargo, hasta ahora la posibilidad de prevenir el desarrollo de la enfermedad es incierta ya que los eventos que parecen desencadenar el proceso autoinmune ocurren meses o años antes del inicio de síntomas en el paciente, por lo cual su prevención es un elemento que sigue siendo un gran desafío de la medicina moderna.

Uno de los aspectos moleculares mejor descritos y que ocurren previo a la generación del proceso autoinmune es el potencial impacto que tiene la alteración de las modificaciones postraduccionales en proteínas o ácidos nucleicos del paciente. Dentro de este aspecto, la citrulinación de proteínas del tejido conectivo ha mostrado potencialmente jugar un papel activo en la modificación de la respuesta inmune adaptativa y desarrollo de autoinmunidad tanto en modelos animales como en estudios clínicos. En ese contexto, el monitoreo de las modificaciones por citrulinación en individuos susceptibles genéticamente o expuestos a factores de riesgo para el desarrollo de AR debería ser una estrategia para conocer en detalle el desarrollo de la patología y así, posiblemente, proponer estrategias para inhibir la progresión de la enfermedad.

Prueba del importante papel de los epítomos citrulinados en AR es el hecho que el biomarcador más específico para la enfermedad es la evaluación de los niveles de Autoanticuerpos Anti-Péptido Citrulinado Cíclico (ACPA, por sus siglas en inglés o también reconocido como aCCP). Sin embargo, aunque esta prueba ha resultado de gran apoyo para la práctica del reumatólogo, no permite dar seguimiento de los eventos de citrulinación específico por el hecho de que la prueba en sí misma es una colección de péptidos antigénicos modificados y derivados de

proteínas blanco (vimentina, α -enolasa, fibrinógeno, entre otras). Es por eso que resulta de gran interés la generación de nuevos anticuerpos en contra de epítomos citrulinados inmurreactivos por pacientes con AR.

En base a una revisión bibliográfica sistemática se identificaron 6 péptidos citrulinados que potencialmente pudieran ser evaluados con el banco de plasmas sanguíneos de una cohorte de pacientes con AR. Sin embargo, debido a problemas asociados a la pandemia de COVID-19, sólo se pudo obtener el péptido sintético citrulinado lineal (HCgp-39) (₂₆₃-PTFGcitSFTLASSET-₂₇₅) y su péptido control (sin citrulina). Empleando un sistema de ELISA indirecto estandarizado se evaluaron de manera comparativa 65 muestras de plasma de pacientes con AR y 6 muestras de donadores sanos.

De manera general, los resultados de este análisis sugieren que el 63% de los pacientes mexicanos con AR mostraron inmunorreactividad para el péptido lineal. Los donadores no mostraron niveles altos de inmunorreactividad. Con el propósito de desarrollar suero hiperinmune específico para este péptido se realizó un protocolo de inmunización con ratones BALB/c. En base a las evaluaciones por ELISA de los sueros de ratones, se observó un ligero incremento de la reactividad al péptido citrulinado del suero "hiperinmune", en comparación con el suero de ratones no inmunizados. Sin embargo, no fue capaz de reconocer proteínas de líquido sinovial de pacientes con AR, por la técnica de western blot y, por lo tanto, no ofreció garantías de que la fusión de células de mieloma con los esplenocitos de los ratones inmunizados pudiera generar clonas específicas para este péptido.

En conclusión, este estudio evidenció que el 63% de una cohorte de pacientes mexicanos con AR fueron inmunorreactivos al péptido ₂₆₃-PTFGcitSFTLASSET-₂₇₅ derivado de la proteína HCgp-39, sugiriendo la presencia de autoanticuerpos afines. Aunque el intento de generar suero hiperinmune en un modelo murino no funcionó, consideramos de gran importancia el proseguir con el trabajo para generar anticuerpos monoclonales en contra de epítomos citrulinados como una estrategia válida para monitorear y caracterizar la progresión de la autoinmunidad en población mexicana.

2. ABSTRACT

Rheumatoid Arthritis (RA) is an autoimmune, chronic and inflammatory disease. It is characterized by polyarthritis and may have systemic manifestations. Without adequate treatment, it can progress to structural deterioration, causing disability. Additionally, this disease is associated with several comorbidities that further decrease the patient's quality of life and increase their risk of death.

It is recognized that the etiology of the disease is multifactorial, in which both genetic and non-genetic factors coincide. However, at this time, it is uncertain whether the disease can be prevented. The events that may trigger the autoimmune process appear to happen many months or even years before the patient experiences symptoms. Therefore, the monitoring and prevention of RA is an element that remains a significant challenge of modern medicine.

One of the best-described molecular aspects that occurs initially is the autoimmune process is triggered by altering post-translational modifications in the patient's proteins or nucleic acids. Citrullination of connective tissue proteins has been shown, to play an active role in modifying the adaptive immune response and potentially developing autoimmunity, both in animal models as in clinical studies. In this context, the monitoring of the modifications by citrullination in exposed individuals who are genetically susceptible or exposed to risk factors for the development of RA should be a strategy to know the development of the pathology in detail and thus, possibly, proposing strategies. to inhibit the progression of the disease.

Proof of the important role of citrullinated epitopes is the fact that the most specific biomarker for the disease are the levels of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Autoantibodies (ACPA, for its acronym in English or also recognized as aCCP). However, it must be recognized that although this test has been of great support for the rheumatologist's practice, it does not allow for the follow-up of specific citrullination events since aCCP's test is a collection of modified antigenic peptides and derivatives of target proteins (vimentin, enolase, fibrinogen, among others). For this reason, the generation of new antibodies against other immunoreactive citrullinated epitopes by patients with RA is of great interest.

In the present study and based on a systematic bibliographic review, 6 citrullinated peptides were identified that could potentially be evaluated with the blood plasma bank of a cohort of patients with RA. However, due to operational problems COVID-19 pandemic related, only the synthetic linear citrullinated peptide (HCgp-39) ($_{263}$ -PTFGcitSFTLASSET- $_{275}$) and its control peptide (without citrulline) could be acquired. Using a standardized indirect ELISA system, 65 plasma samples from patients with RA and 6 samples from healthy donors were comparatively evaluated. In general, the results of this analysis suggested that 63% of the Mexican patients with RA showed immunoreactivity for the citrullinated peptide. On the other hand, donors didn't show high levels of immunoreactivity.

In order to develop specific hyperimmune serum for this peptide, an immunization protocol was carried out with BALB/c mice. Based on ELISA evaluations of mouse sera, a slight increase in citrullinated peptide reactivity of "hyperimmune" serum was observed as compared to serum from non-immunized mice. However, it was not able to recognize proteins from the synovial fluid of patients with RA, by the western blot technique and, therefore, it did not offer guarantees that the fusion of myeloma cells with the splenocytes of the immunized mice could generate clones. specific for this peptide.

In conclusion, this study showed that 63% of a cohort of Mexican patients with RA were immunoreactive to the $_{263}$ -PTFGcitSFTLASSET- $_{275}$ peptide derived from the HCgp-39 protein, suggesting the presence of related autoantibodies. Although the attempt to generate hyperimmune serum in a mouse model did not work, we consider it of great importance to continue with the attempts to generate monoclonal antibodies against citrullinated epitopes as a valid strategy to monitor and characterize the progression of autoimmunity.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Artritis Reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, crónica, sistémica e inflamatoria; caracterizada por sinovitis crónica en la membrana sinovial de la articulación, siendo éste el tejido principal afectado. Fundamentalmente es poliarticular y los pacientes pueden presentar compromiso sistémico. Sin un tratamiento adecuado puede progresar hacia un deterioro estructural articular irreversible en cartílago y hueso y eventualmente discapacidad^(1,2). Generalmente sus signos y síntomas son: astenia, malestar general, dolor (artralgia), que puede ser desde leve a intenso y persistente incluso en reposo; rigidez articular matutina que dura más de una hora⁽³⁾. Adicionalmente, también pueden presentar tumefacción que se desarrolla gracias al tejido sinovial proliferante, el cual se encuentra engrosado y edematizado debido al incremento de líquido sinovial. Estas manifestaciones suelen presentarse con una distribución simétrica. Asimismo, se reconoce la presencia de erosiones óseas y deformidades al alcanzar la AR establecida⁽⁴⁻⁶⁾.

Es importante resaltar que, se ha descrito que la gravedad de la enfermedad, la actividad de la enfermedad y la discapacidad están fuertemente vinculadas a la mortalidad prematura en pacientes con AR⁽⁷⁾. Varios estudios reportan que la mortalidad se incrementa en los pacientes, con respecto a individuos sanos, además de que las complicaciones cardiovasculares y sistémicas aumentan considerablemente. Por otro lado, es bien reconocido que los pacientes con esta enfermedad pueden desarrollar diversas manifestaciones extraarticulares como vasculitis, glomerulonefritis, pericarditis, sequedad de ojos y boca, nódulos reumatoides entre otras. Estas manifestaciones pueden favorecer el desarrollo de manifestaciones cardiovasculares y metabólicas que comprometen la calidad de vida de los pacientes reumáticos^(5,8).

3.1.1 Epidemiología

La prevalencia de esta enfermedad se ha calculado entre el 0.5 y el 1% en pacientes adultos caucásicos^(9,10). En México fue realizado un estudio de prevalencia entre los años 2009-2011, a través de la metodología tipo COPCORD, donde se evaluaron poblaciones de 5 diferentes estados (Nuevo León, Chihuahua, Sinaloa, Ciudad de México y Yucatán). Este estudio mostró una prevalencia de 0.7 y 1% para Nuevo León y Ciudad de México, respectivamente; de 1.8-1.9% para Chihuahua, Sinaloa y de 2.8% para Yucatán. En base a este estudio, se sugiere que hay una importante heterogeneidad entre diferentes regiones de nuestro país. Actualmente se considera que México tiene una prevalencia promedio de AR de 1.6%⁽⁹⁾, que es una de las más elevadas del mundo. Además, la prevalencia se ve modificada por variables el lugar de residencia, etnia, sexo, nivel socioeconómico, etc. Se sabe que es 3 veces más frecuente en mujeres que en varones y esto es atribuible al efecto de hormonas sexuales sobre el control del sistema inmunológico y es más frecuente en mujeres con la función ovárica disminuida en la menopausia que se asocia con un aumento de citocinas proinflamatorias⁽¹¹⁾. Asimismo, es frecuentemente diagnosticada entre la cuarta y quinta década de edad^(9,12,13).

3.1.2 Etiología

El origen de esta enfermedad es una combinación compleja de factores genéticos, no genéticos (ambientales, inmunológicos) y eventos estocásticos individuales, pero aún se desconoce el origen que favorece el desarrollo de AR.

3.1.2.1 Factores de Riesgo Genéticos

La AR es considerada una enfermedad poligénica, existen más de 100 loci asociados con la enfermedad⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾. Desde luego la implicación del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) por sus siglas en inglés, es crucial para el desarrollo de la enfermedad ya que las moléculas del MHC que se expresan en las superficies de algunas células del hospedador se encargan de exponer complejos péptido-MHC (antígenos peptídicos provenientes de diferentes compartimentos celulares a diferentes poblaciones de linfocitos T) y es uno de los genes que mayormente se ha

caracterizado.

Los loci del MHC, se localizan en el brazo corto del cromosoma 6 que ocupa un gran segmento del ADN. Hay tres clases de genes polimórficos, que codifican diversas proteínas homologas, pero con estructuras distintas que se ubican en diferentes tipos de células y difieren los mecanismos en la presentación de antígenos^{(16) (17)}.

La clase del MHC I, codifica los polipéptidos transmembrana de 44 kDa asociados a la superficie de la célula con un polipéptido de 12 kDa llamado microglobulina- β_2 . Hay tres genes de clase I del MHC llamados HLA (Human Leucocyte Antigen o Antígeno Leucocitario Humano), se dividen en HLA-A, HLA-B y HLA-C; mientras que el MHC Clase II, está compuesto por glicoproteínas transmembranales que consisten en dos cadenas de heterodímeros de polipéptidos α y β de 34 kDa y 29 kDa, respectivamente. Cada cadena tiene dos dominios: alfa-1 y beta-1. Juntos, los dominios alfa-1 y beta-1 forman una hendidura de unión de péptidos que puede unir los fragmentos de antígenos derivados del exterior de la célula. También hay tres loci de clase II, denominados HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR; al grupo de alelos del MHC presente en cada cromosoma se le denomina haplotipo⁽¹⁸⁾.

En particular, se ha identificado la asociación con ciertos haplotipos específicos (DR1, DR4 y DR10) de los alelos del HLA, a una mayor frecuencia en el desarrollo de AR en personas que presentan la secuencia de aminoácidos QKRAA, QRRAA o RRRAA, específicamente en las posiciones 70-74 de la cadena β (DRB1), la cual está codificada en el bolsillo de unión de péptidos P4 con carga positiva conocida como “epítipo compartido” (EC)⁽¹⁸⁾. Esta región se localiza en el surco del péptido antigénico con la molécula del MHC clase II y tal como se presenta en la Figura 1, es fundamental para el acoplamiento y selección del péptido antigénico por la célula presentadora de antígeno (CPA)^(14,19,20). Esta región ha demostrado favorecer la interacción con epítipos citrulinados y, como consecuencia, podría llevar a la activación y selección de clonas autorreactivas de linfocitos T; favoreciendo una respuesta autoinmune⁽²¹⁾. En esta Figura 1, se representa la localización del “Epítipo Compartido”. Los péptidos citrulinados que

tienen carga negativa o neutra se unen más fácilmente al bolsillo P4, el cual tiene cargas positivas (representados en círculos rojos); la citrulina reconocida directamente por el TCR, está en las posiciones -2 y -1 de péptidos como α enolasa y colágeno tipo II.

El riesgo relativo de desarrollar la enfermedad en un individuo se ve incrementado al tener un familiar de primer grado con la enfermedad, pero no garantiza que se desarrollará, ya que los factores genéticos no son los únicos involucrados que pueden desempeñar un papel en el inicio y progresión de la enfermedad⁽¹⁵⁾.

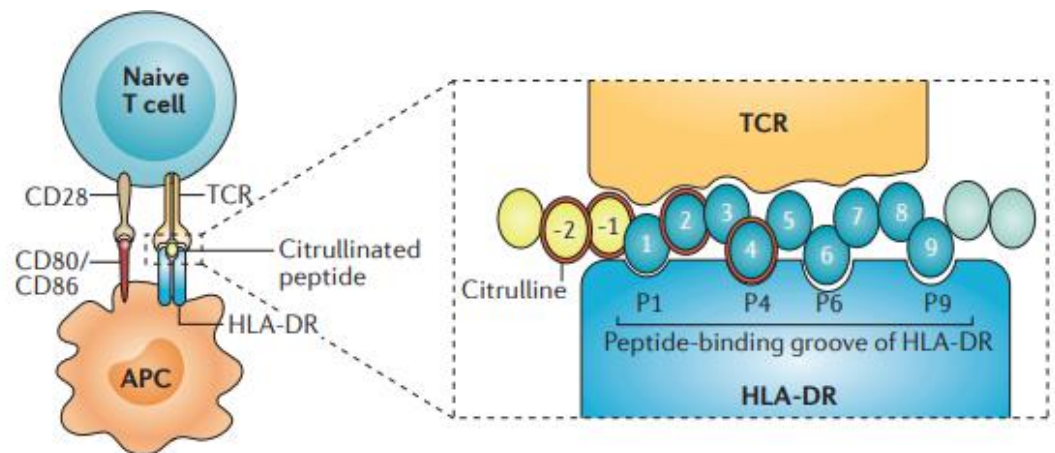


Figura 1. Representación gráfica del bolsillo de unión de péptidos P4 de las moléculas (HLA-DR SE) asociadas con la AR. Tomado de Malmström, Catrina, et al⁽²²⁾

3.1.2.2 Factores de riesgo no genéticos.

Se asume que contribuyen a un 30-50% del desarrollo de AR. Dentro de ellos, el hábito del tabaquismo es uno de los más estudiados y se ha demostrado que en conjunto con la presencia del epítipo compartido pueden incrementar la probabilidad de desarrollar la AR en más del 70%⁽²³⁾. También se ha sugerido que otros elementos como el microbioma, el perfil hormonal o la dieta pudieran jugar un papel complementario en el desarrollo de la autoinmunidad⁽¹²⁾.

Por otro lado, agentes infecciosos como la bacteria *Porphyromona gingivalis* que habita en la flora oral, parece promover el desarrollo de esta enfermedad. Como se representa en la Figura 2, durante el proceso de periodontitis, el patógeno *P.*

gingivalis, favorece la expresión de la enzima bacteriana PAD, (Peptidyl Arginina Deiminasa), la cual ocasiona la citrulinación de las proteínas y consecuentemente las proteínas modificadas inducen la ruptura de tolerancia del sistema inmunológico y de ahí que se lleve a cabo la inmunidad adaptativa y la formación de auto anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinados (ACPA)^(24,25).

En la Figura 2, también se representa gráficamente de manera general como las enzimas PAD, ejecutan la desaminación del grupo amino (NH₂⁺) de los residuos del aminoácido Arginina (Arg) de la proteína por un oxígeno; mediante hidrólisis, lo que ocasiona que el aminoácido arginina (cargado positivamente) cambie por el aminoácido citrulina y quede sin carga⁽²⁶⁾.

Las enzimas PAD4 que se expresan en granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, etc.), se localizan mayormente en el núcleo celular y su distribución tisular es extensa. Ver Anexo 1. Además, se ha demostrado que PAD 4 tiene un papel regulador en la formación de las “Trampas extracelulares de Neutrófilos” (NET) por sus siglas en inglés, esto al mediar la descondensación de la cromatina mediante citrulinación de histonas que sucede durante la NETosis, un proceso biológico en el que los neutrófilos liberan estas redes como mecanismo para atrapar y destruir patógenos invasores⁽²⁷⁾.

Por otro lado, las isoenzimas PAD2 se expresan comúnmente en otro tipo de células y tiene una distribución citoplasmática ^(41,42).

Estudios bioquímicos han confirmado que estas enzimas dependen de altas concentraciones de Ca²⁺ (cantidades >1,5 mM), para llevar a cabo la conversión de aminoácidos ⁽⁴³⁻⁴⁵⁾.

En ese sentido, se ha sugerido que procesos inflamatorios, asociados con la muerte celular por piroptosis, necroptosis o NETosis podrían permitir la liberación de Ca²⁺ de mitocondrias o retículo endoplasmático, posibilitando la activación de las enzimas PAD ^(28,28-30).

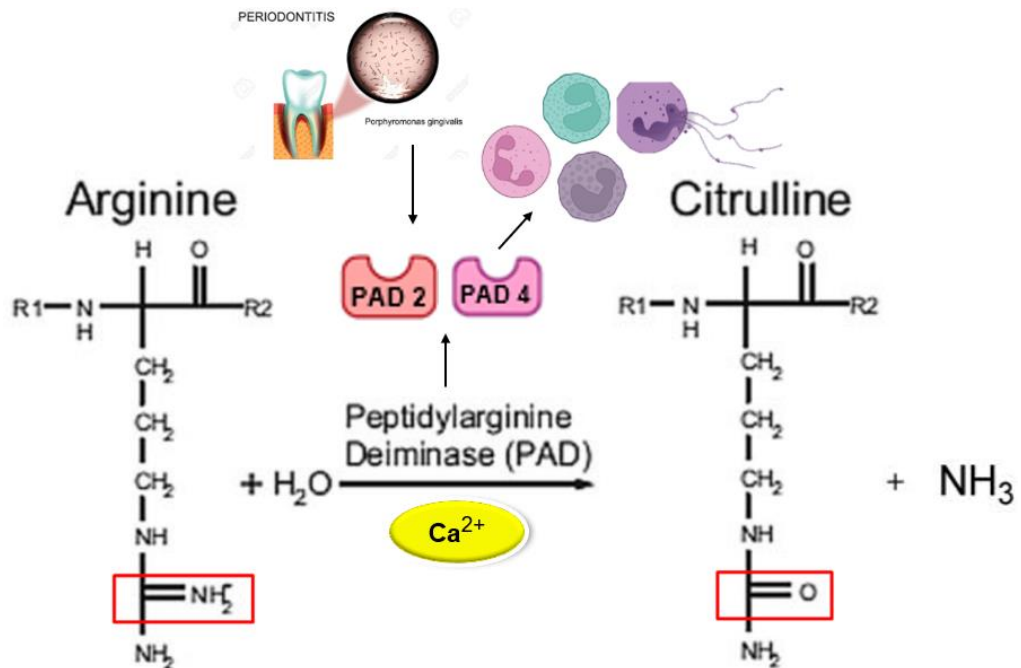


Figura 2. Posible papel de la PAD en la citrulinación de proteínas. Tomado y modificado de Brito Rocha, Baldo. et. al ⁽³¹⁾

La contaminación del aire es otro factor importante medioambiental que ha sido evaluado en varios estudios. La exposición de las personas a contaminantes está asociada con la liberación de citocinas proinflamatorias, ya que el primer contacto ocurre con el macrófago alveolar, quien es la célula encargada de fagocitar las partículas inhaladas y generar una respuesta inmune ⁽³²⁾. Por su parte, estos factores de riesgo son importantes, porque se ha propuesto que ante la ausencia de los factores ambientales, a pesar de tener susceptibilidad genética, no favorecería el desarrollo de la AR^(32,33).

Por otro lado, como se describe en la Figura 3, los factores genéticos y las modificaciones epigenéticas van a propiciar un estado de susceptibilidad en ciertos individuos. Sin embargo, se asume que se requiere que otros elementos como los anteriormente mencionados participen para propiciar la autoinmunidad, que en etapas tempranas de la enfermedad es indetectable, dado que no hay síntomas. Se sugiere que posteriormente existe una etapa donde se va consolidando la alteración autoinmune donde se ha observado la presencia de autoanticuerpos en contra de péptidos citrulinados varios años (5-15 años) antes del inicio de síntomas⁽¹²⁾. Así

mismo, como consecuencia del proceso autoinmune los niveles de células efectoras y mensajeros químicos proinflamatorios (citocinas/quimiocinas) se incrementan dando paso a los síntomas y signos de la enfermedad ya establecida.

Cabe mencionar que se han descrito etapas preclínicas de la enfermedad intentando homologar la terminología que se usaría en fases clínicas tempranas que pueden padecer los individuos con riesgo a desarrollar por completo artritis reumatoide. Algunos términos propuestos son individuos en riesgo de AR con factores genéticos y ambientales sin anomalías en marcadores de laboratorio y sin los síntomas clásicos de la enfermedad; individuos en riesgo de AR con anomalías de laboratorio (autoanticuerpos ACPA y FR), pero sin signos de artritis inflamatoria; individuos en riesgo a AR debido a síntomas de artritis inflamatoria sin evidencia clínica o de imagen de sinovitis; individuos con sinovitis en imágenes pero sin artritis inflamatoria aparente y finalmente, individuos con artritis inflamatoria clínica aparente que aún no cumplen con los criterios de clasificación de AR⁽³⁴⁾.

Sin embargo, se recomienda definir a las fases específicas hasta el desarrollo de la AR como:

- a) Factores de riesgo genéticos para AR
- b) Factores de riesgo ambientales para la AR
- c) Autoinmunidad sistémica asociada a la AR
- d) Síntomas sin artritis clínica
- e) Artritis no clasificada
- f) AR, enfermedad establecida⁽³⁴⁾

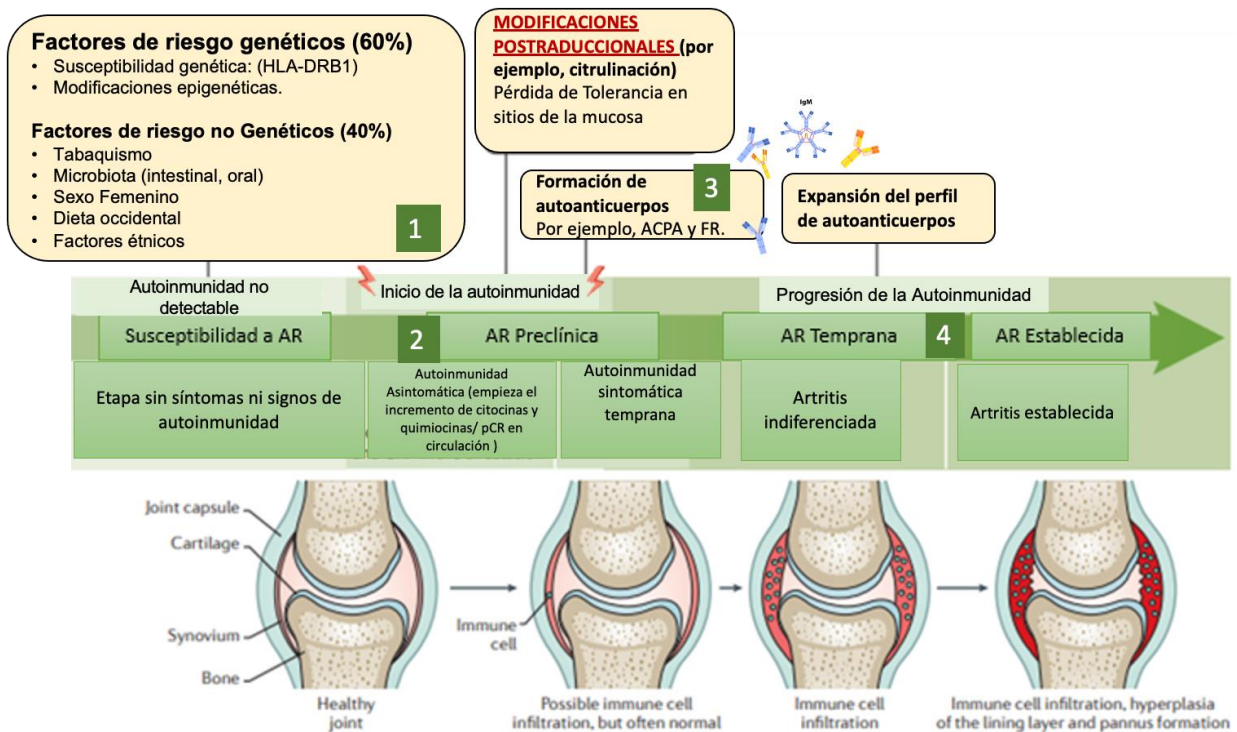


Figura 3. Desarrollo hipotético de la artritis reumatoide. Modificado de Smolen, J. S. et al ⁽³⁵⁾

Las hipótesis más recientes sugieren que el inicio de los síntomas articulares son dependientes de la activación de la respuesta inmune, posiblemente como resultado de procesos inflamatorios crónicos a nivel de las mucosas. En estas condiciones se propone que procesos inflamatorios mecánicos y cotidianos van a encontrar una respuesta específica y agresiva por la presencia de autoanticuerpos contra epítopos citrulinados o células autorreactivas. En ese momento (AR temprana), se sugiere que se iniciará la infiltración de células inmunes activadas al espacio sinovial, lo cual desencadena la hiperproliferación de sinoviocitos y los procesos de hematopoyesis, desencadenando una sinovitis; que, como consecuencia, se genera un nuevo tejido llamado *pannus*, el cual es una fuente importante de metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) y demás activadores de osteoclastos.

En este nuevo tejido inflamatorio es donde se alojan linfocitos T y B activados que facilitan la formación de centros germinales a nivel local, es decir, dentro del mismo tejido sinovial, perpetuando así la respuesta inmunológica específica y autorreactiva y fomentando una expansión clonal de estos linfocitos ^(22,36).

3.1.3 Inmunopatogénesis.

El proceso inflamatorio en la AR comienza con la activación de sistema inmune innato a nivel articular y la generación de citocinas y demás mediadores proinflamatorios liberados que inducirán la migración de células tales como neutrófilos, monocitos, células dendríticas, linfocitos, células NK, desde la sangre hasta la membrana sinovial. Además, durante la AR temprana ocurre una hiperproliferación de fibroblastos y se favorece la producción del líquido sinovial en el espacio articular⁽³⁷⁾. En los procesos inflamatorios agudos, la migración leucocitaria se inicia con la expresión de moléculas de adhesión (L-selectina, ICAM-1) sobre la superficie de los linfocitos. Posterior a la infiltración de células sanguíneas en el espacio sinovial, se llevan a cabo dos procesos: la inflamación y la remodelación tisular, este último, se observa tras la activación de condrocitos, osteoblastos y osteoclastos que propician la generación de proteínas de matriz extracelular y factores de crecimiento, tales como TGF- β ^(38,39).

Las células presentadoras de antígeno como las células dendríticas o los macrófagos activados en el medio proinflamatorio de la membrana sinovial inflamada producen moléculas como las citocinas distintivas del proceso (TNF- α , IL-1 β , IL-6) que contribuyen a reclutar y activar más células inmunes innatas como son los neutrófilos, que una vez activados liberan niveles altos de sustancias oxidantes, más agentes proinflamatorios, fosfolipasas, defensinas, mieloperoxidasas, en el sitio de la articulación. Asimismo, se producen citocinas efectoras importantes como IL-8, o la IL-17A⁽⁴⁰⁾.

Los fibroblastos, y macrófagos expresan receptores tipo Toll (TLR3 y TLR4), sugiriendo su participación en la estimulación temprana de la respuesta inmune innata. Se ha demostrado que tras estímulos de los PRRs que como se menciona en la sección de las abreviaturas, son los receptores responsables de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos. Una vez activados los TLR3 inducen la producción de citocinas como IL-6 y de metaloproteasas de matriz como MMP1^(41,42).

Posterior a la presentación de antígeno por el MHC clase II, se activan las células T CD4⁺, que dependiendo del microambiente de citocinas van a

diferenciarse en fenotipos específicos, Th1 Th2 y Th17. Las células Th1, se caracterizan por producir una serie de citocinas proinflamatorias, tales como IL-2, IFN γ y TNF α , de manera que activan la respuesta inmune celular. La IL-17, producida por células Th17, a su vez promueve la producción de IL-6, IL-8 y GM-SCF a partir de células ya mencionadas que aumentan el receptor activador del ligando del factor nuclear NF-kB (RANKL), y la promoción de la producción de metaloproteinasas de matriz (MMP-1); además de estimular la expresión de varias quimiocinas, incluidas CXCL8, CXCL1, CXCL2, CCL20, CCL2 y CCL7); de tal manera que todo esto contribuye a la erosión ósea, destrucción del cartílago y la neo angiogénesis⁽⁴³⁾.

Por otro lado, las células con fenotipo Th2 produce citocinas tales como IL-4, IL-6, IL-10 y a su vez pueden favorecer la diferenciación y reactivación de las células B autorreactivas de memoria, la formación de centros germinales y linfocitos T foliculares que favorecen la diferenciación a células plasmáticas productoras de auto anticuerpos⁽⁴³⁾.

Como ya se ha mencionado anteriormente, un tipo de autoanticuerpos contra péptidos citrulinados (ACPA), parecen tener una gran relevancia en la AR. En individuos ACPA+, se demostró que estos autoanticuerpos pueden estar dentro de la cavidad articular, contribuyen a la patología de AR ya sea por activación directa de los macrófagos, activación de osteoclastos por la formación de inmunocomplejos que pueden activar la vía del complemento y perpetuar la inflamación^(37,44). Es importante mencionar que existe una probable relación estrecha entre los anticuerpos ACPA con la activación de los osteoclastos; motivo por el cual en pacientes con ACPA seropositivo se les adjudica un progreso rápido en etapas tempranas del desarrollo de la enfermedad y pueden llevar a una enfermedad erosiva más rápidamente. La primera evidencia de que los osteoclastos podrían tener un papel importante en la patología dependiente de ACPA surgió de estudios de ACPA policlonales purificados del suero de pacientes con AR ACPA positivo. Estos ACPA policlonales promovieron la diferenciación y activación de los osteoclastos *in vitro*, y causaron erosión ósea y osteopenia ⁽⁴⁵⁾.

Finalmente, la cronicidad de la enfermedad pudiera además deberse a la unión de inmunocomplejos a los receptores Fc para IgG (FcγR), expresados en la superficie de células efectoras del sistema inmunológico. La unión promueve aumento de citotoxicidad celular, fagocitosis, desgranulación celular y la producción constante de citocinas y quimiocinas (22,46,47).

La Figura 4 ilustra cómo los autoanticuerpos (ACPA) pueden contribuir a la inflamación de las articulaciones. Como consecuencia, los eventos dependientes de ACPA y RF podrían contribuir al inicio y propagación de la inflamación sinovial crónica, y actuar de manera sinérgica(22).

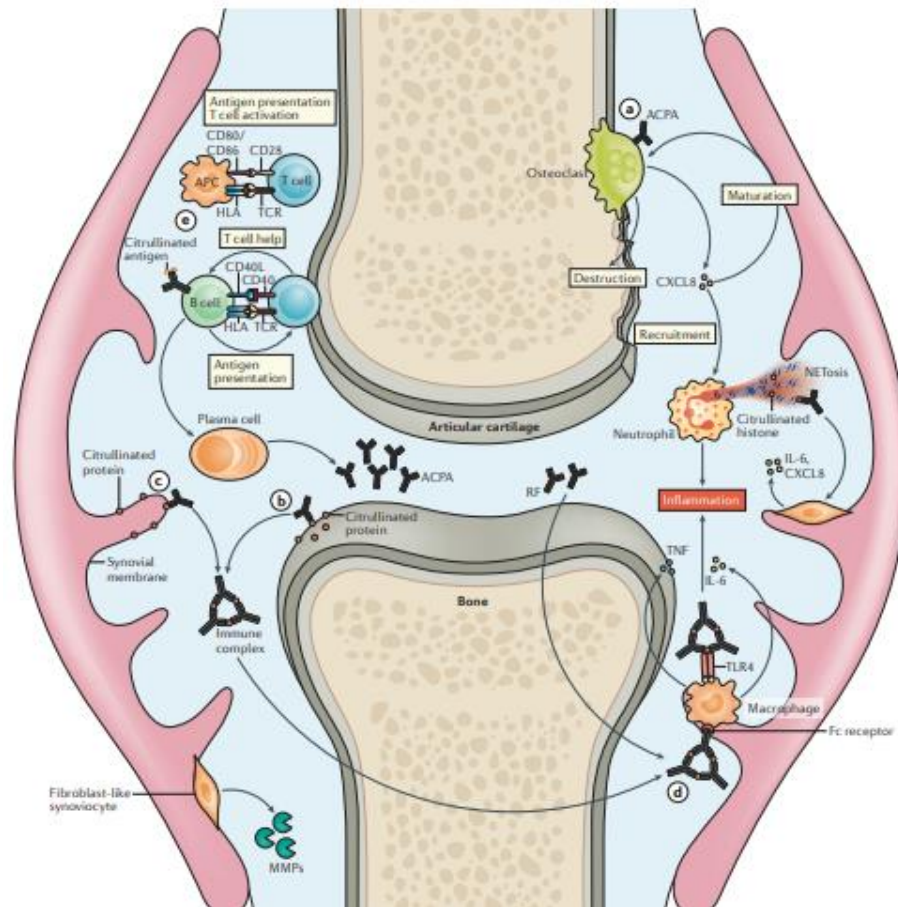


Figura 4. La cascada inflamatoria en la AR establecida. Tomado de Malmström, Catrina, et al (22).

3.2 Modificaciones postraduccionales de proteínas

La modificación de proteínas se refiere a la modificación química de las proteínas después de su biosíntesis, las proteínas están sujetas a más de 200 tipos de modificaciones postraduccionales tales como fosforilación, carbamilación, glicosilación, ubiquitinación, s-nitrosilación, metilación, N-acetilación y citrulinación, entre otras ⁽³⁶⁾.

3.2.1 Citrulinación

La citrulinación es un tipo de modificación postraducciona de proteínas (MPT), irreversible, lo cual significa que la proteína después de ser sintetizada sufre un cambio químico en su estructura primaria⁽⁴⁸⁾.

Como la citrulinación reduce la carga neta de proteínas a través de la pérdida de una carga positiva, es decir, sufre desaminación del grupo amino (NH_2^+) de los residuos del aminoácido Arginina (Arg) de la proteína por un oxígeno, ocasiona que el aminoácido arginina (cargado positivamente) cambie por el aminoácido citrulina sin carga⁽²⁶⁾.

El proceso de citrulinación es catalizado por la enzima peptidil arginina deiminasa (PAD). Se han identificado en el genoma humano cinco isoenzimas: (PAD1– 4 y 6). Las enzimas más estudiadas y que han sido implicadas en el desarrollo de la AR seropositiva son las isoenzimas PAD2 y PAD4⁽³⁹⁻⁴⁰⁾. PAD2, es el miembro más ubicuo de las isoenzimas, la enzima PAD4 se expresa en los granulocitos (neutrófilos y eosinófilos, etc.) y además PAD2 tiene una distribución citoplasmática mientras que PAD4 se encuentra principalmente en el núcleo celular ^(41,42). Estudios bioquímicos han confirmado que estas enzimas dependen de altas concentraciones de Ca^{2+} (cantidades $>1,5 \text{ mM}$), para llevar a cabo la conversión de aminoácidos ⁽⁴³⁻⁴⁵⁾. Además, se ha demostrado que PAD 4 tiene un papel regulador en la formación de las trampas extracelulares de neutrófilos NET, esto al mediar la descondensación de la cromatina mediante citrulinación de histonas⁽²⁷⁾.

En ese sentido, se ha sugerido que procesos inflamatorios, asociados con la muerte celular por piroptosis o NETosis podrían permitir la liberación de Ca^{2+} de mitocondrias o retículo endoplasmático, posibilitando la activación de las enzimas

PAD^(28,28–30).

Sin embargo, como se ilustra en la Figura 5, estas enzimas requieren de un entorno reductor, que es necesario para conservar el sitio libre de tiol cisteína requerido para la catálisis por parte de las PAD y controlar la activación de las enzimas⁽⁴⁹⁾. No obstante las propiedades oxidantes como las que otorgan las especies Reactivas de Oxígeno (ROS) generadas por NADPH oxidasa durante la NETosis debería inhibir la actividad catalítica de PAD2 y PAD4 y así de igual manera modular el proceso de citrulinación⁽⁵⁰⁾.

3.2.2 Impacto fisiológico de la Citrulinación

La citrulinación de proteínas está implicada en diversos procesos fisiológicos además de NETs y piroptosis, tales como inflamación, diferenciación celular, regulaciones genéticas, queratinización, apoptosis, necrosis, autofagia, entre otros, que ocurre en diferentes tejidos alterando así la estructura de varias proteínas⁽⁴⁸⁾.

Cabe mencionar, la sobreexpresión de PAD 4 y la actividad enzimática está presente en varias enfermedades, incluida la artritis reumatoide (AR), la enfermedad de Alzheimer (EA), la esclerosis múltiple (EM), el lupus (LES), la enfermedad de Parkinson y algunos tipos de cáncer⁽⁵¹⁾.

Como ya se mencionó antes, esto es debido a este residuo de arginina modificado, que puede aumentar la hidrofobicidad de las proteínas y conducir consecuentemente al despliegue de proteínas y alterar sus interacciones intra e intermoleculares⁽⁵²⁾. A nivel proteico, la citrulinación provoca una reducción en la masa molecular de 0,9840 Da (aproximadamente 1.0 kDa), por cada arginina modificada, sin embargo, el cambio más significativo es en términos del cambio en el punto isoeléctrico, impactando de igual manera en su hidrofobicidad⁽²⁶⁾.

Además, en el caso particular de la AR, se podría alterar la unión y afinidad a los alelos del locus HLA-DR en el MHC clase II^(53,54).

3.2.3 Hipercitrulinación

En condiciones normales, las proteínas citrulinadas no desencadenan una respuesta autoinmune, pero en individuos genéticamente predispuestos puede conducir a la producción de ACPA. Al haber una suma de mecanismos que activan desmesuradamente a las enzimas PAD, se promueve una amplificación de la respuesta enzimática^(31,55,56). Como sucede cuando hay cuerpos apoptóticos que no son eliminados de forma eficaz por los fagocitos se ocasiona hipercitrulinación^(57,58).

Como se describe en la parte central de la Figura 5, donde se muestra el daño membranolítico inducido por el huésped, por medio del “complejo de ataque a la membrana” (MAC), impulsado gracias a componentes tóxicos tales como proteínas formadoras de poros del huésped (perforina y granzima), potentes inductores de la “hipercitrulinación leucotóxica” (LTH) siendo una posible vía que promueve cantidades exageradas de Ca⁺ intracelular que además permite la lisis osmótica y consecuentemente la hipercitrulinación y la formación de ACPA en sitios extra articulares^(23,24).

Hay que hacer notar que este tipo de eventos fueron inicialmente descritos dentro de la membrana sinovial de pacientes con AR y se representa en la parte final de la Figura 5, donde posiblemente continúan vías membranolíticas y se mantiene la hipercitrulinación en la articulación con AR.

Se sabe que el aumento de citrulinación de histonas por PAD4 es esencial en la descondensación de cromatina induciendo la expulsión al espacio extracelular de fibras de ADN, liberando proteínas granulares tras el estallamiento celular^(56,59). De manera que los NET son una fuente importante de algunos neo-antígenos (proteínas citrulinadas) que se externalizan^(31,55,60).

Por otra parte, algunos sustratos de las enzimas PAD relacionados con AR, son diversos y tienen mayor afinidad a varias proteínas estructurales como son (vimentina, β -actina, γ -actina, fibrinógeno, α -enolasa, colágeno tipo I-II, tenascina, fibronectina y queratina)^(57,61), así como de proteínas implicadas en la regulación de la transcripción de genes (histonas H1, H2A, H3 y H4)⁽⁵⁸⁾. De manera que, incluso

la presencia de anticuerpos agonistas contra las PAD puede potenciar la citrulinación extracelular antes de que las enzimas se inactiven por oxidación^(59,62).

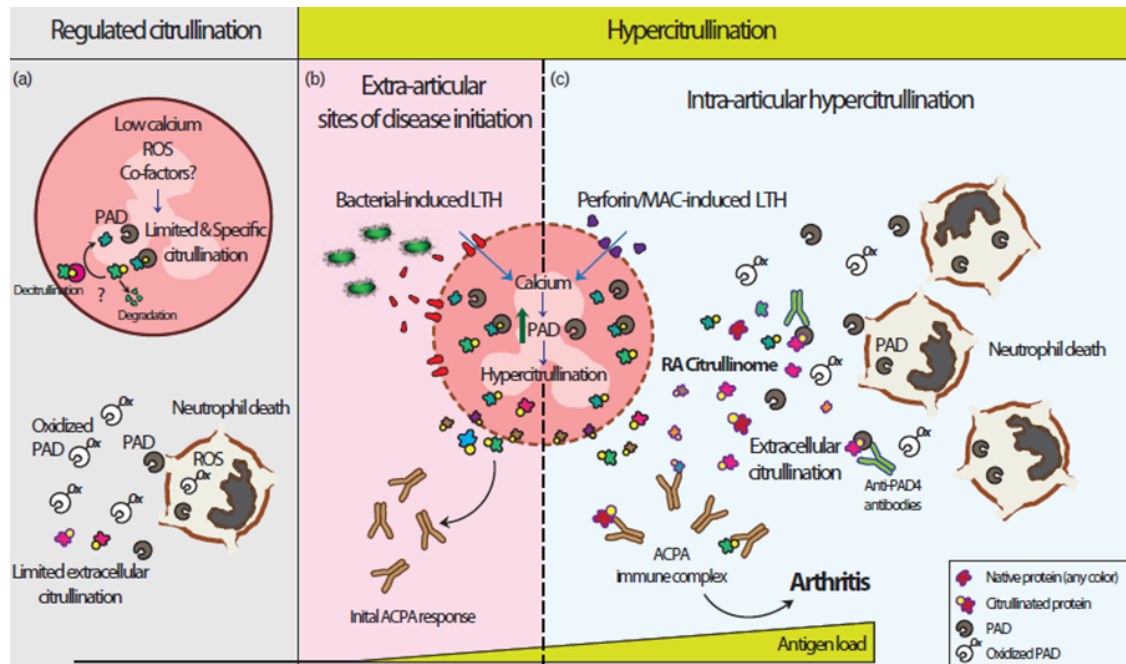


Figura 5. Citrulinación normal y desregulada en la artritis reumatoide.
Tomado de Darrah E. y Andrade, F. et al ⁽⁶¹⁾.

3.2.4 Citrulinoma

Por su parte, el análisis proteómico de los componentes celulares y solubles en el líquido sinovial de la AR ha identificado más de 100 proteínas citrulinadas, que incluyen sustratos tanto intracelulares como extracelulares y juntos comprenden el “citrulinoma” de la AR, o sea, el conjunto de proteínas modificadas en una célula como resultado del microambiente celular. Sin embargo, no se comprende completamente la importancia de este citrulinoma para la patogénesis de la AR y la generación de anticuerpos proteicos anti citrulinados ACPA ⁽⁶³⁾.

A pesar del considerable número de proteínas citrulinadas que se encuentran en el líquido sinovial de la AR, solo unas pocas se han identificado como dianas de ACPA. Es posible que la activación de PAD pueda apuntar accidentalmente a nuevos sitios en proteínas, generando neo epítomos no tolerados en moléculas

anormalmente hipercitrulinadas. Esto apoya la hipótesis de que la generación de sitios únicos de citrulinación en proteínas puede impulsar su inmunogenicidad ^(64,65).

Es por eso que se sugiere que este pequeño cambio en proteínas nativas del individuo con predisposición genética genera nuevos epítomos y es ahí donde podría estar en el origen de una respuesta de intolerancia por parte del sistema inmune adaptativo y, que consecuentemente puede llevar a la generación de una respuesta inmune específica.

Además la hipercitrulinación genera cantidades superiores al umbral de antígenos provenientes del individuo⁽⁶⁶⁾.

4. ANTECEDENTES

4.1 Anticuerpos de Diagnóstico

Los Anticuerpos Monoclonales (AcM) son inmunoglobulinas que por modificación química y selección celular corresponde a conjunto de anticuerpos específicos y derivados de una sola clona de células plasmáticas, con la capacidad de reconocer un solo determinante antigénico. Este tipo de proteínas modificaron ampliamente las capacidades de análisis de la investigación biomédica a principios de los años 80's y, en el presente, constituyen además una herramienta terapéutica para la clínica. En este sentido, los AcM no sólo han permitido incrementar el diagnóstico de diferentes patologías, sino participar como instrumentos terapéuticos e industriales. Uno de los retos de la investigación con AcM, radica en la identificación de nuevos blancos con el objetivo de aumentar su eficacia terapéutica, así como la mejora de la efectividad y afinidad de los propios anticuerpos⁽⁶⁷⁾. Por su parte, los auto anticuerpos representan un sello distintivo de varias enfermedades autoinmunes, como lo es la AR, jugando un papel en la patogénesis importante. Se han identificado varios sistemas de auto anticuerpos asociados a esta enfermedad, tales como los anticuerpos anti-carbamilados, anticuerpos anti-acetilados, anti-PAD4, anticuerpos anti-péptido citrulinado, entre varios otros⁽⁶⁸⁾.

Dos pruebas diagnósticas basadas en la detección de autoanticuerpos de la AR son principalmente las más usadas hasta la fecha; incluso una de ellas ha perdurado desde los antiguos criterios diagnósticos ACR/EULAR de 1987.

4.1.1 Factor Reumatoide

El Factor Reumatoide (FR), es un autoanticuerpo con estructura similar a las inmunoglobulinas IgM. Las IgM son pentámericas y se caracterizan por su capacidad para unirse a la porción Fc de otras inmunoglobulinas, especialmente de la IgG.

De tal forma que, al unirse a esta porción, puede formar complejos inmunitarios, lo que puede contribuir a la inflamación y el daño tisular en la AR. Este anticuerpo fue descubierto hace más de 80 años, y de hecho ha sido utilizado como herramienta diagnóstica y marcador pronóstico en AR, sin embargo, no tiene suficiente especificidad, de manera que se ha condicionado su uso e interpretación en la práctica clínica, ya que la positividad de FR, por sí sola no es suficiente para el diagnóstico. Se sabe que el 15% de la población sana puede tenerlo a títulos bajos, y esta proporción aumenta con la edad. Además su presencia destaca en muchas otras enfermedades Su sensibilidad va de entre 75% a 80% y tiene una especificidad de 60% a 70%⁽⁶⁸⁾.

4.1.2 Anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico

Resulta de gran trascendencia el hecho de los anticuerpos anti-péptido citrulinado cíclico (aCCP o ACPA) son el marcador clínico más específico y temprano del que se tiene noticia hasta ahora en la AR, pudiendo detectarse varios años antes del inicio de los síntomas inflamatorios, es precisamente que por eso son una prueba serológica muy utilizada. Estos auto anticuerpos están dirigidos contra epítomos citrulinados derivados de una o más proteínas del propio individuo⁽⁶⁴⁾. Tiene una sensibilidad que varía entre 75% a un 80% y una especificidad de 90% al 95% siendo así un biomarcador serológico útil para el diagnóstico de AR en aproximadamente el 70% de los sujetos ⁽⁶⁹⁾.

Estos anticuerpos han sido incluidos en kits comerciales y los ACPA, pueden dirigirse a varias dianas diferentes de proteínas citrulinadas (especificidades finas de los ACPA), es decir, estas pruebas cuentan con cierta capacidad para identificar diferentes subtipos de anticuerpos o marcadores específicos asociados con la enfermedad, que se combinan en las pruebas comerciales anti-CCP de hoy en día

y desde su aparición se han ido perfeccionando, ya que algunos se han modificado de forma lineal a forma cíclica, con el fin de mejorar su sensibilidad y especificidad para detectar autoanticuerpos relacionados con la AR, de manera tal que permitan hacer una determinación acerca del estado de salud o la fase de la enfermedad de un individuo con sospecha de AR por parte de la evaluación clínica y radiológica exhaustiva de un médico Reumatólogo.

Como antes se mencionó, las pruebas han ido evolucionando de tal modo que la primera generación de test (aCCP1) usó a la filagrina citrulinada como sustrato antigénico, al ser la primera proteína citrulinada identificada en AR⁽⁶⁴⁾.

La segunda generación (aCCP2), contempló a los mejores péptidos de una biblioteca de 12 millones de péptidos y se comercializó en 2002. En esta generación se incluyen anticuerpos contra queratina citrulinada (AKA) y anticuerpos anti-filagrina (AFA), en conjunto estos presentaron una sensibilidad de 42% al 72% y especificidad de 80% y 98%^(56,64). En 2016 se informó de anticuerpos en contra de vimentina acetilada y en ensayos ELISA han detectado autoanticuerpos frente a su forma citrulinada: vimentina anti-citrulinada mutada (antiMCV) con sensibilidad amplia en valores y anticuerpos (anti-Sa), que se dirigen contra la proteína nuclear llamada “proteína scl-70” también llamada topoisomerasa II, la cual no es muy sensible 37%-50%, pero sí muy específica 97%-99%⁽⁶⁸⁾. El péptido alfa enolasa-1 citrulinado se identificó en 2008 y está asociado con auto anticuerpos aislados de articulaciones. La alfa-enolasa 1, es una isoenzima glucolítica que cataliza la conversión de 2-fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato y es blanco importante de anticuerpos.

Por otro lado los auto anticuerpos anti-CEP1, son anticuerpos que se dirigen en contra de una proteína estructural variante de la tubulina y se comportan de manera similar a los anti-MCV coexistiendo en las pruebas anti-CCP, por lo que la gran mayoría de los pacientes con AR, los presenta pero no son específicos de la enfermedad ya que también se presentan en otras enfermedades autoinmunes^(66,70).

Por su parte, Anti-MCV y Anti-AKA, muestran poca especificidad (70%) en comparación con aCCP⁽⁶⁶⁾. La prueba ELISA que evalúa el fibrinógeno anti citrulinado (hFibA) muestra una sensibilidad que oscila entre el 48% y el 73%, con una especificidad de hasta el 95% en la AR establecida y una sensibilidad del 32% con una especificidad del 88% para predecir la progresión a AR.

Otra herramienta, es el kit ELISA aCCP EUROINMUN* (reconoce anticuerpos IgG anti-Vimentina mutada citrulinada, anti-Filagrina, anti α -enolasa, anti-CEP1 con sensibilidad de: 78.5%-81% y especificidad: 98%⁽⁷⁰⁻⁷³⁾).

Finalmente, los kits de tercera generación (aCCP3), como es el caso de QUANTA LITE, fabricado por INOVA DIAGNOSTICS, han reportado tener una mejor precisión a comparación de las dos generaciones anteriores de kits lanzados al mercado, teniendo una sensibilidad del 74% y una especificidad de 96% (56,74,75).

De igual forma, la prueba (aCCP3.1) y el conjugado “14-3-3 *eta*”, demostró tener una sensibilidad de entre el 64-70% y puede ayudar en el diagnóstico precoz de la enfermedad en individuos que son más propensos a una rápida progresión de la enfermedad, ya que este kit incluye la proteína “14-3-3 *eta*”, que es un mediador inflamatorio derivado de la erosión durante la patogénesis de la AR⁽⁷⁶⁾.

A pesar de existir diversas generaciones de kits en el mercado, no han demostrado tener una alta especificidad ni sensibilidad, por lo que se han ido buscado mejores herramientas moleculares.

4.1.3 Inmunorreactividad e inmunogenicidad de epítomos citrulinados de diversas proteínas.

Algunas de las proteínas que frecuentemente son reportadas como citrulinadas, son componentes importantes en la funcionalidad y estructura de la cavidad articular. Anatómicamente la membrana sinovial recubre la cara interna de las articulaciones diartrodiales y consta de dos capas, una capa íntima superficial conformada de sinoviocitos fibroblásticos y una capa profunda que se encuentra vascularizada e inervada que se encarga de fabricar el líquido articular que lubrica el espacio y favorece el movimiento indoloro además de nutrir al cartílago y modular la temperatura⁽⁷⁷⁾. El colágeno es la proteína más abundante del cuerpo humano representando hasta un 25% y es muy abundante en tejidos conectivos. Existen varios subtipos y el colágeno α triple hélice se encuentra en tejidos fetales, piel sangre, vasos sanguíneos, pulmones, útero y tendones⁽⁷⁸⁾.

Estudios de inmunorreactividad con epítomos modificados de péptidos citrulinados correspondientes a proteínas como filagrina epidérmica humana, profilagrina, fibrinógeno α y β ; han demostrado estar presentes en muestras de pacientes con AR en poblaciones asiáticas y caucásicas ^(79–82). Así mismo la vimentina citrulinada mutada (anti-MCV), en un estudio con muestras de pacientes suecos con AR (n=273), demostró estar presente en el 70.7% de los pacientes, mientras que en 158 pacientes, es decir, el 57.9% de esos mismos pacientes fueron anti-CCP positivos en el momento del diagnóstico, con especificidades de 95% y 96%, respectivamente⁽⁸³⁾.

En otro estudio de Rusia, en búsqueda de nuevos biomarcadores de la enfermedad específicos para el diagnóstico temprano de AR y para la predicción de brotes, pusieron a prueba epítomos de péptidos citrulinados diseñados potencialmente para convertirlos en herramientas valiosas para la diagnosis y controlar la progresión de dicha enfermedad. Por lo que ellos probaron su hipótesis desarrollando una batería de 20 péptidos citrulinados y mutados, procedieron a analizarlos en una cohorte de individuos positivos con AR y controles; estudiando su reactividad como antígenos en inmunoensayos ELISA. Un péptido citrulinado de

21 aminoácidos de longitud derivado de fibrinógeno mostró una alta reactividad hacia los anticuerpos en muestras de pacientes caucásicos con AR, además de un título alto de anticuerpos contra este epítipo justo antes de los brotes (Epítipo 2 de fibrinógeno sometido a citrulinación); adicionalmente extendieron el estudio comparando la reactividad de estos epítipos en diferentes enfermedades como LES, y monitorizaron su reactividad y comportamiento para dilucidar la especificidad de 3 epítipos de péptidos derivados de fibrinógeno que tuvieron mayor actividad para inducir anticuerpos. Midieron la actividad de la enfermedad por (SDAI, CDAI) para AR y (SLEDAI) para LES; además incluyeron en el estudio a “respondedores deficientes” a MTX.

En sus resultados se evidenciaron elevaciones de anticuerpos anti-E2 del péptido citrulinado derivado del Fibrinógeno, que sucedieron aproximadamente 2 meses antes del brote y disminuyó con la reducción de la actividad de la enfermedad para AR, caso contrario con LES, que no fue reactivo para esos pacientes, evidenciando que era específico sólo para AR. Otras variantes de proteínas citrulinadas tenían menor reactividad y sensibilidad a la actividad de la enfermedad, por ejemplo, el epítipo 1 (E-1).

Es por eso que el epítipo 2 (E-2) de péptido citrulinado de fibrinógeno se propuso como herramienta para el diagnóstico de auto anticuerpos a un epítipo derivado de fibrinógeno, que además se correlacionó con la actividad de la enfermedad así como el número de articulaciones afectadas⁽⁶⁴⁾.

En la evidencia bibliográfica consultada para fines de esta investigación, el péptido CII derivado del colágeno II (359-369) es inmunodominante en murinos y humanos. Por su parte, en una cohorte de pacientes con AR temprana <12 meses, (n=286), se detectaron anticuerpos IgG hacia el colágeno citrulinado con una prevalencia del 40.4%., destacando como “crítica” la posición del residuo de arginina 361 para ese efecto. Analizaron anticuerpos de suero que reaccionaron con el péptido citrulinado, particularmente en la secuencia peptídica en posición 361 y 368 en CII triple hélice⁽⁸⁴⁾. De igual manera, en otro estudio detectaron la presencia de anticuerpos anti-CII, tanto en suero como líquido sinovial, al comienzo de la

enfermedad, donde paradójicamente observaron una disminución de niveles séricos de anticuerpos a medida que avanza la enfermedad. En animales la inmunización de CII nativa con adyuvante induce artritis por colágeno (CIA) caracterizada por anticuerpos contra CII y poliartritis inflamatoria⁽⁸⁵⁾. Por otra parte, un fragmento helicoidal del CII (CB10), logró ser detectado por autoanticuerpos en 88% de pacientes con AR a comparación de 24% con CII sin citrulinación. Midieron la distribución de los niveles de anti-CB10 en 82 pacientes con AR temprana y 136 controles, y la mayoría de los pacientes tenían anti-CB10 aunque la frecuencia fue mayor en los pacientes que lograron la remisión 87%; 67% en actividad persistente y 75% en enfermedad erosiva⁽⁸⁶⁾.

Otra proteína de interés es el fibrinógeno, el cual, es hidrolizado por la proteasa trombina para producir monómeros que, junto con el fibrinógeno alfa (FGA), fibrinógeno beta (FGB) y el fibrinógeno gamma (FGG), polimerizan para formar una red de soporte de fibrina insoluble, la cual tiene una función importante en la hemostasia como uno de los componentes principales de la coagulación sanguínea. Además, funciona durante las primeras etapas de la reparación de heridas para estabilizar la lesión y guiar la migración celular durante la reepitelización⁽⁸⁷⁾. Es por esto que diversos autores estudian esta proteína⁽⁸⁸⁻⁹¹⁾ y en estudios posteriores midieron la inmunogenicidad de 3 secuencias peptídicas: Fib α (371-383), Fib α (R84), Fib α (79-91).

En este estudio, analizaron 2 cepas de ratones (ratones transgénicos DR4-IE y ratones C57L/B6 tipo salvaje). Detectaron proliferación de células T solo en ratones transgénicos DR4 inducida después de la exposición in vitro con los primeros 2 péptidos a los 70 días. Adicionalmente evaluaron el reconocimiento por parte de auto anticuerpos anti-fibrinógeno citrulinado en ambas cepas por técnica de ELISA. Fib α R84 fue el que más indujo respuesta de Linfocitos T. Cabe mencionar que se utilizó fibrinógeno de ratón (hFib) y humano (CithFib), para comparar las respuestas entre grupos. Los ratones DR4 inmunizados con (CithFib), tuvieron un aumento significativo en la reactividad con el anticuerpo IgG. Midieron y compararon la secreción de citocinas producidas por los ratones inoculados con

ambos tipos de fibrinógeno (hFib), (CithFib) y obtuvieron niveles altos en la producción de IFN γ con CithFib citrulinado en posición 84, hasta un (48%) de los ratones tipo DR4-IE; caso completamente opuesto a los ratones C57BL/6 (B6) tipo salvaje. De este trabajo concluyeron que CithFib en posición 84 o Fib α (Cit84), es un antígeno que con frecuencia es el blanco de autoanticuerpos en ratones con células portadoras del alelo del EC en el MHC clase II asociado a DRB1*0401⁽⁸⁸⁾.

Por su parte, el Fibrinógeno alfa con la secuencia de aminoácidos (31-50), también ha sido de interés tras comparar mediante ELISA su inmunorreactividad para 4 isoformas citrulinadas de fibrinógeno α en una cohorte de 347 pacientes con AR establecida y con 236 pacientes de otras enfermedades reumáticas, tales como artritis psoriásica o espondilitis anquilosante; de manera que no hubo asociación entre el epítipo compartido de HLA-DR y los anticuerpos contra diferentes péptidos citrulinados de Fib α , pero sí hubo asociación entre el alelo de riesgo PTPN22 y la positividad de la isoforma Fib α cit35 y Fib α 263. De igual manera midieron la inmunorreactividad de anticuerpos séricos contra los diferentes péptidos citrulinados, cuantificándolos por ELISA de manera que los anti-fib α 35 estuvieron presentes en un 20.17% de sus muestras; anti-fib α 263 en un 21.54% y anti-fib α 425 sólo en un 17%; analizaron su asociación entre la reactividad sérica de estos antígenos en pacientes aCCP+ estando presentes en un 70%, 73% y 59% respectivamente⁽⁹¹⁾.

En cambio, el Fibrinógeno β con la secuencia de aminoácidos (36-52), fue identificado como epítipo de interés al influir en la patogenia de la AR en una cohorte de 81 pacientes nativos de Canadá y 195 controles (familiares sanos). De esta manera, analizaron la inmunorreactividad de isotipos de ACPA (IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM) así como FR (IgM/IgA) de muestras de suero mediante ELISA y nefelometría y determinaron la especificidad en individuos sanos y pacientes con AR.

Los anticuerpos contra el antígeno Sa y anti Fib β , fueron detectados por ELISA y se corroboró su presencia por Western Blot. La prevalencia de ACPA en los pacientes con AR fue de 91.4% y la de sus familiares sanos fue de 19%. Los

isotipos más comunes fueron IgG e IgA. En 72 pacientes hubo mayor porcentaje de individuos IgG ACPA positivos con AR cuyos sueros reconocieron anti vimentina (anti-Sa), e IgG ACPA anti fibrinógeno citrulinado con los porcentajes de 61.1% y 59.7% respectivamente⁽⁹²⁾.

En otro estudio de casos y controles del norte de Suecia, utilizaron 717 muestras del biobanco, 386 de ellas eran de individuos con sospechas de AR y 204 ya eran de pacientes con AR establecida.

Analizaron la Inmunorreactividad de los auto anticuerpos contra 10 péptidos citrulinados y tres los categorizan como un "patrón" al estar más presentes en esas muestras; tales péptidos fueron: fibrinógeno β citrulinado, péptido citrulinado de alfa enolasa-1 y filagrina citrulinada, de los que se evidenciaron elevaciones en la inmunorreactividad 3.5 años antes de que los pacientes con AR iniciaran síntomas de la enfermedad. Por otro lado, el análisis de la intensidad de fluorescencia indicativa de niveles de anticuerpos provenientes del suero y del plasma, en ensayos multiplex, aumentó significativamente para auto anticuerpos contra Fib β 36-52, en individuos con enfermedad preclínica.

Tras comparar las 717 muestras con los controles se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de inmunorreactividad ($p < 0.0001$), con un 64.8% de detección para anticuerpos anti-fibrinógeno β citrulinado; 67,3%, para anti-CEP-1 y 46,2% para anticuerpos contra filagrina. Así mismo el Odds Ratio (OR) para el desarrollo de AR en individuos que expresan la combinación anti-CEP1 y anti-Fib beta 36-52 fue de 40.4% (IC 95% 19,8-82,3)⁽⁷⁰⁾.

Finalmente, de un estudio publicado en 2019 que tuvo una duración de 24 meses con un total de 1022 pacientes (692 mujeres y 330 hombres) con AR temprana, midieron y analizaron respuestas de ACPA para 21 péptidos citrulinados y péptidos con Arg normal, mediante microarreglos y ELISA. Además, analizaron su frecuencia de los auto anticuerpos y su asociación con datos de actividad clínica DAS 28, datos que evaluaban la progresión radiográfica (método de Sharp/Van der Heijde; puntuación de Larsen), y el tratamiento de los pacientes.

El nivel de inmunorreactividad fue más alto para autoanticuerpos anti Vim 60-75 y anti Fib α 60-74. Y los más frecuentes fueron: anti-Fib β 60-74, Anti Vim 60-75 y Anti-Fib β 36-52. Este último fue claramente más frecuente en el 78.1% de pacientes ACPA+ y buscaron una posible asociación entre algunos de estos autoanticuerpos y la progresión radiológica de los pacientes durante los primeros 24 meses después de ser diagnosticados con la enfermedad. Pacientes que dieron positivo a Anti Vim 2-17, tenían un pronóstico radiológico más severo a comparación de pacientes que no tuvieron inmunorreactividad contra este auto anticuerpo⁽⁹³⁾.

Por otra parte, otro péptido citrulinado de gran interés, es el derivado del agrecano, que constituye un proteoglicano abundante en el cartílago articular y que se ha sugerido participa en la estimulación de la producción de citocinas proinflamatorias por los linfocitos T, además brinda resistencia a la compresión en el cartílago y se une con gran avidéz al ácido hialurónico a través de una región globular N-terminal⁽⁹⁴⁾. En un estudio previo se evidenció que el epítipo citrulinado del proteoglicano se une a los alelos HLA-DR y promueve respuestas inmunogénicas por parte de los linfocitos T en sistemas *in vitro*. De esta manera, compararon las respuestas proliferativas y de producción de citocinas a epítipos de colágeno citrulinado tipo II, vimentina, agrecano 84-103 y fibrinógeno α 79-91 en 6 controles sanos y 21 pacientes australianos con AR HLA EC⁺.

Siendo el epítipo del agrecano 84-103, el más inmunogénico. Conjuntamente, también observaron que los pacientes con AR temprana tenían más probabilidades de producir IL-6 en respuesta del agrecano citrulinado y pacientes con AR de larga duración tenían más probabilidades de producir IL-6 en respuesta a más de un epítipo, ya que también fue notable la producción de altos niveles de esta citocina pro inflamatoria en respuesta al Fibrinógeno citrulinado α 79-91⁽⁹⁰⁾.

En un estudio de mapeo de 27 epítipos, identificaron el epítipo llamado "5/4E8" (ATEGRVRVNSAYQDK), epítipo perteneciente al primer dominio globular (G1) de Proteoglicano humano o (PG), y estaba claramente asociado con la activación de células T y generar artritogenicidad en ratones BALB/c⁽⁹⁵⁾.

Posteriormente se probó una versión extendida y citrulinada (Cit) del péptido “5 / 4E8” (VVLLVATEGCitVRVN-SAYQDK). De modo que, su objetivo fue evaluar la respuesta de células Th17 al Agrecano citrulinado en pacientes con AR.

Se estudiaron 28 muestras de PBMC de pacientes con AR y 18 controles sanos de Reino Unido contra las formas de agrecano citrulinado y agrecano sin citrulinar. Evaluaron las respuestas de proliferación celular, secreción de citocinas mediante ensayo de incorporación de H-timidina ELISA y análisis de citocinas intracelulares. Obtuvieron respuestas proliferativas a agrecano citrulinado en más del 60 % de pacientes, pero no en controles sanos. Las PBMC estimuladas por el péptido citrulinado de Agrecano correspondientes a los pacientes con AR produjeron niveles altos de IL17, IFN γ además de una inducción de linfocitos T CD4+ la cual fue confirmada por citometría de flujo; a comparación de las PBMC de controles sanos. Posteriormente correlacionaron las respuestas proliferativas específicas del péptido agrecano citrulinado en la producción de IL17/ IFN γ , y el título de aCCP, dado que sus datos de IL17 e IFN γ en PBMC fue mayor con una respuesta al péptido citrulinado, realizaron regresión lineal para analizar esta relación. Obteniendo que la proliferación en respuesta al péptido agrecano citrulinado se correlacionó fuertemente con la producción de IL17 ($R=0.724$), además de buscar correlación con otros parámetros clínicos como aCCP, PCR (proteína C reactiva), VSG, resultando tener una correlación medianamente obtenida respecto a aCCP ($R= 0.512$)⁽⁹⁶⁾.

Por otra parte, en un estudio muy reciente, empleando modelos murinos humanizados que expresan estos alelos DRB01: 01, DRB1 04:01 en el MHC clase II, se evaluaron nuevamente las respuestas de células T, restringidas a HLA DR1 y DR4, para un conjunto de péptidos citrulinados de las proteínas agrecano, vimentina, fibrinógeno y colágeno tipo II. Interesantemente observaron que la citrulinación mejora la afinidad de unión por estos alelos del HLA, pero no lo hace siempre. Además, no necesariamente predice la generación de respuestas por linfocitos T, sin embargo, los péptidos derivados de agrecano si estimularon una fuerte respuesta proliferativa de células T, en este caso, la inmunización de ratones

DR1 con este péptido generó una respuesta moderada, pero significativa en contra del péptido del agrecano citrulinado. De esta manera el péptido Cit-Agg estimuló la secreción de niveles más altos de citocina IL-17A, en comparación del péptido no citrulinado. Esto sugiere que el residuo citrulinado del agrecano juega un papel importante en el reconocimiento por el TCR ya que el agrecano tuvo una mayor afinidad en los DR1 positivos, aunque estimuló pobremente las células T⁽⁹⁷⁾.

4.1.4 Suero hiperinmune.

El suero hiperinmune es un producto biológico que se obtiene a partir de la sangre de animales que han desarrollado una respuesta inmune robusta, donde están presentes anticuerpos específicos de ciertos determinantes antigénicos particulares. Este suero resulta de un proceso conocido como inmunización, donde el animal o individuo son expuestos a la presencia del antígeno, bajo condiciones inflamatorias (respuesta inmune innata), favoreciendo que el sistema inmune por un proceso activo pueda generar una respuesta inmune celular o humoral específica. Algo que cabe resaltar es que, en el presente proyecto, a diferencia de los anticuerpos monoclonales que derivan de una sola clona de células plasmáticas y, por lo tanto, todos los anticuerpos reconocerán un sólo epítipo, en el suero hiperinmune, los anticuerpos afines a un antígeno son posiblemente derivados de diferentes células plasmáticas y, por lo tanto, podrían reconocer varios epítipos.

El suero hiperinmune, como ya se mencionó habitualmente se obtiene por la inmunización reiterada de un antígeno en un animal, con el fin de generar una respuesta inmunitaria. De este animal se toma una muestra de sangre y de esta muestra se obtiene el suero que finalmente se purifica para obtener la variedad de anticuerpos policlonales de interés.

De igual manera, los AcP tienen una amplia gama de aplicaciones, incluyendo pruebas de diagnóstico, así como análisis biológicos cualitativos y cuantitativos. Son utilizados en técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, ELISA sándwich, etc ⁽²⁹⁾.

5. JUSTIFICACIÓN

Se ha sugerido que uno de los mecanismos frecuentemente asociados con la generación de la autoinmunidad, en el marco de la AR, son las modificaciones postraduccionales de proteínas del tejido conectivo, donde la citrulinación parece jugar un papel muy importante. En ese sentido, algunos estudios previos han sugerido que el estudio de las alteraciones por citrulinación de proteínas e incluso la exploración del "citrulinoma", podría ser una estrategia para reconocer los posibles factores etiológicos y predecir el desencadenamiento de la fase clínica.

Aunque existen algunos anticuerpos monoclonales específicos combinados en las pruebas comerciales contra los residuos de citrulina de antígenos proteínicos, su utilidad para caracterizar los cambios del "citrulinoma" es limitada. Además, hay que considerar que permite detectar sólo algunos neo-antígenos, a partir de lo cual se clasifican los pacientes como "seropositivos". Sin embargo, se ignora si los pacientes seronegativos no presentan autoanticuerpos contra epítomos citrulinados o sencillamente no están incluidos en la prueba comercial. Se reconoce que algunos pacientes con AR tienen en el suero anticuerpos que no reaccionan con el antígeno de los kits comerciales, pero sí lo hacen al enfrentarlos a otras proteínas citrulinadas, lo que sugiere la existencia de otros epítomos antigénicos que no están presentes en las pruebas aCCP convencionales.

Con el propósito de iniciar la generación de herramientas inmunológicas para el estudio del citrulinoma en pacientes con AR, propusimos en el presente estudio un protocolo para seleccionar epítomos citrulinados no incluidos en las pruebas comerciales y que potencialmente pudieran ser novedosos. A continuación, con el propósito de evaluar su pertinencia para el diagnóstico de pacientes mexicanos, se propone evaluar su inmunorreactividad contra un panel de plasmas pacientes con AR. Un porcentaje de reconocimiento alto por parte del plasma de pacientes mexicanos sugerirá que podría ser, no sólo novedoso, sino de potencial utilidad la generación de un suero hiperinmune en ratones.

Hay que mencionar que el proyecto originalmente planteado tuvo que modificarse debido a la pandemia provocada por SARS-CoV-2, dado que entre un tercio y la mitad del año 2020 no se pudo trabajar en el laboratorio 13 de la Facultad

de Farmacia. Es por eso que la búsqueda bibliográfica sistemática de estudios de epítomos citrulinados pretendía sustituir la falta de acceso a las instalaciones del laboratorio. Adicionalmente, problemas en la aduana mexicana limitaron la importación de otros 2 péptidos citrulinados que se había considerado evaluar de manera conjunta. Cabe mencionar que el péptido evaluado ²⁶³-PTFGcitSFTLASSET-²⁷⁵ derivado de la proteína HCgp-39, no está incluido hasta la fecha en los kits comerciales aCCP.

Consideramos, a pesar de todos los problemas, que estos resultados serán de notable originalidad dado que pueden ser el punto de partida para generar herramientas moleculares específicas ayudaran a evaluar posibles alteraciones moleculares en pacientes, incluso antes de la generación de auto anticuerpos, que serían de gran importancia en la caracterización molecular de las etapas preclínicas o durante la fase indiferenciada de la AR ⁽³⁷⁾.

6. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿En qué medida, el péptido citrulinado PTFGcitSFTLASSET será inmunorreactivo a los plasmas de una cohorte de pacientes mexicanos con artritis reumatoide?

¿La inmunización de ratones con el péptido soluble permitirá la generación de anticuerpos en el suero hiperinmune?

7. HIPOTESIS

- **H_{a1}**: La inmunorreactividad del plasma de una cohorte de pacientes mexicanos con artritis reumatoide será mayor al péptido PTFGcitSFTLASSET que a su contraparte no citrulinada.
- **H_{o1}**: La inmunorreactividad del plasma de una cohorte de pacientes mexicanos con artritis reumatoide será similar entre el péptido PTFGcitSFTLASSET y su contraparte no citrulinada
- **H_{a2}**: La obtención de los títulos de anticuerpos específicos del suero de los ratones inmunizados con el péptido PTFGcitSFTLASSET fueron altos.
- **H_{o2}**: La obtención de los títulos de anticuerpos específicos del suero de los ratones inmunizados con el péptido PTFGcitSFTLASSET no lograron ser altos.

8. OBJETIVOS

8.1 Objetivo General

Evaluar la inmunorreactividad del péptido citrulinado PTFGcitSFTLASSET contra un banco de plasmas de pacientes mexicanos con artritis reumatoide, como estrategia para el desarrollo de nuevas herramientas inmunológicas específicas.

8.2 Objetivos Específicos

1. Generar una base de péptidos citrulinados, a partir de una revisión bibliográfica, eligiendo péptidos que fueran inmunorreactivos en pacientes con AR.
2. De esta base, seleccionar un subconjunto de 3-6 péptidos en base a su posible reconocimiento en pacientes y estabilidad química.
3. Mandar a sintetizar los péptidos anteriores y evaluar la inmunorreactividad específica del péptido citrulinado ²⁶³-PTFGcitSFTLASSET-²⁷⁵ de plasmas de pacientes mexicanos con AR.
4. Analizar las variables demográficas, clínicas e inmunológicas de los pacientes y categorizarlo de acuerdo con la inmunorreactividad presentada contra el péptido.
5. Estandarizar las condiciones experimentales para la generación de suero hiperinmune contra el péptido citrulinado ²⁶³-PTFGcitSFTLASSET-²⁷⁵ en ratones BALB/c.

9. MATERIAL Y MÉTODOS

9.1 Diseño del Estudio.

Estudio transversal y experimental.

9.2 Revisión Bibliográfica.

Se realizó una búsqueda bibliográfica sistemática en las bases de PubMed (NLM), Crochane y Web of Science, con las palabras clave: "Citrullinated epitope"/"Rheumatoid arthritis", o "citrullinated peptide" y "Rheumatoid arthritis" y combinaciones tanto en Abstract como en el Título. La búsqueda básica en estas plataformas nos proporcionó 348 publicaciones, por lo que se procedió a eliminar duplicaciones, metaanálisis y revisiones bibliográficas, para concentrarse en los estudios originales que manejan muestras de pacientes (plasma o líquido sinovial). Una vez realizada esta selección, se procedió a realizar una tabla concentradora de información donde se describen algunos antígenos citrulinados con posible importancia clínica.

En la Figura 6, se muestra el proceso de recopilación de las fuentes bibliográficas y selección de aquellas secuencias peptídicas que consideramos pertinentes. Dado que fueron realizados varios procesos de selección de secuencias de aminoácidos, inicialmente 6 secuencias de péptidos citrulinados fueron contempladas como opción para solicitar su síntesis, sin embargo, debido a altos costos para su síntesis, se eligieron sólo 3 péptidos correspondientes a proteínas que se describían en la bibliografía como epítomos potenciales para el uso clínico y diagnóstico en AR.

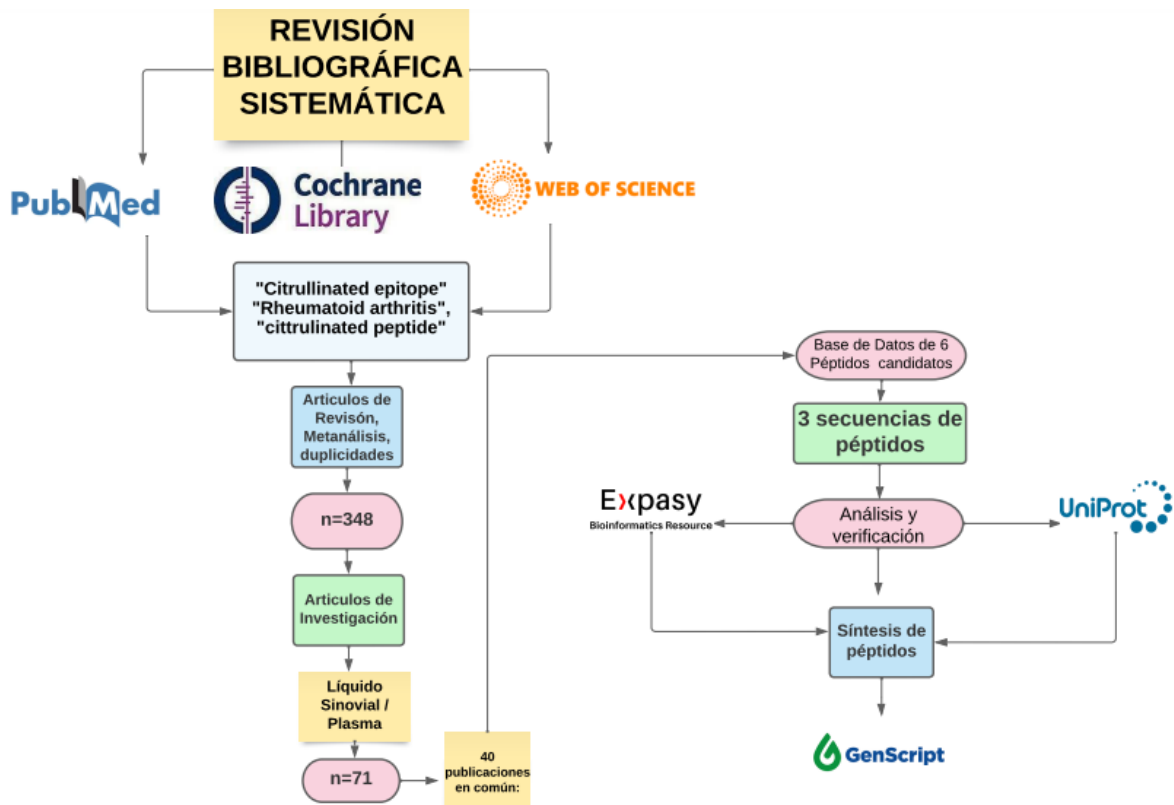


Figura 6. Diagrama de flujo de la búsqueda sistemática de información científica de péptidos citrulinados y su cotización para síntesis.

9.2.1 Selección de péptidos a evaluar

En base a lo anterior, se contemplaron 3 péptidos para ser sintetizados, en su versión control, o sin Arg citrulinada. De manera que se realizó la cotización con diferentes empresas. En la Tabla 2, se describen dichas secuencias de péptidos que fueron seleccionados por ser secuencias de aminoácidos de proteínas que no están en los kits comerciales, ya que resultan ser innovadores e incluso estuvieron muy frecuentes en diversos estudios con muestras de pacientes, además algunos péptidos lograron evidenciar que indujeron inmunogenicidad.

9.2.2 Síntesis de péptido citrulinado y no citrulinado

A partir de los seis péptidos, tres fueron seleccionados por no estar presentes en los kits comerciales de prueba aCCP y por ser considerados de innovación con posible uso para generar suero hiperinmune en ratones.

Se cotizaron las secuencias de estos tres péptidos en forma lineal, en su versión citrulinada y no citrulinada con diversas compañías (*Probiotek, Thermofisher, eBioResearch*), pero finalmente la síntesis de los péptidos quedó a cargo de la compañía *Genscript*, por lo tanto, se enviaron esas secuencias para su síntesis.

Solamente los péptidos citrulinado y control de Fibrinógeno α (31-50) y de HCgp39 (263-275), pudieron ser completados por esta empresa, ya que, por problemas técnicos *Genscript* no pudo sintetizar los péptidos de Aggrecan (84-103).

Es así como sólo se produjo la cantidad de 1.5mg de las secuencias de péptidos por péptido citrulinado (PTFGcitSFTLASSET) y 1.9 mg del péptido control (PTFGRSFTLASSET) correspondientes al HCgp39 (263-275).

9.2.2.1 Solubilización de péptidos control y citrulinado

Los péptidos liofilizados y almacenados a -20°C , fueron centrifugados a 10,000 rpm por 10-13 segundos.

El polvo fue pesado del vial del péptido se fraccionó y se hicieron alícuotas de 100 μl para cada péptido en condiciones asépticas bajo campana.

Ambos productos (péptido citrulinado y no citrulinado) se diluyeron en diferentes soluciones para ser solubilizados. El péptido citrulinado se diluyó en 3% (w/v) de hidróxido de amonio por recomendación del fabricante (*Genscript*) y se sometió a sonicación por 30 minutos en periodos de 5 minutos, manteniendo en frío. Las alícuotas fueron almacenadas a -20°C . Por otra parte, el péptido control, (con Arginina), fue solubilizado en ácido acético al 10%, quedando una concentración por cada alícuota de este péptido sin citrulinar de [0.83g/ml]. También las alícuotas fueron almacenadas a -20°C .

9.3 Panel de plasma de pacientes a evaluar.

Para la evaluación de la inmunorreactividad en contra del péptido citrulinado se utilizó un banco de plasmas de pacientes con AR que cumplen los criterios de ACR-EULAR, 2010 (n=65), correspondientes al proyecto “Aparición de Nueva Diabetes en Artritis Reumatoide” (ANDAR) 2018-2019. Estas muestras fueron colectadas entre 2018-2019 en el servicio de reumatología del Hospital General de Cuernavaca "José G. Parrés, dependiente de los Servicios de Salud de Morelos. El proyecto fue aprobado por el comité de ética en investigación. Las muestras de sangre fueron procesadas 2-3 horas después de su colecta, recuperando el plasma sanguíneo, el cual fue almacenado en crioviales de 2 mL entre -75°C y -80°C en el ultracongelador del laboratorio 13 de la Facultad de Farmacia, UAEM. También se usaron plasmas de donadores voluntarios, como grupo control, que provienen del Centro Estatal de Transfusión sanguínea de Cuernavaca, Morelos (2015-2018).

Antes de ser utilizadas las muestras de plasma en los diferentes experimentos, se descongelaron las alícuotas y se les añadió azida de sodio 0.1% en el cuarto de cultivo con nivel de bioseguridad II.

9.3.1 Evaluación de inmunorreactividad por péptidos citrulinados.

Para determinar la inmunorreactividad específica contra el péptido citrulinado, con muestras de plasma de pacientes con AR, se empleó la técnica de ELISA indirecta. Previo al trabajo con la totalidad de los plasmas de los pacientes y los donadores, se estandarizaron las condiciones de ensayo, empleando muestras de plasma de 6 pacientes con AR y muestras de 6 controles sanos.

En la primera fase, para determinar la dilución ideal de estreptavidina-HRP; se evaluaron diferentes diluciones de estreptavidina-HRP (R & D systems): 1:1,000, 1:2,000, 1:3,000, 1:10,000 y 1:50,000 y del anticuerpo anti-IgG humano-Biotina (Jackson): 1:500, 1:800, 1:1000, 1:1500, 1:2,000, 1:5,000 y 1:10,000.

Dado que el objetivo fue optimizar las diluciones de los reactivos, el primer ensayo, se realizó con la estreptavidina-HRP (R & D systems). El reactivo se incubó en la placa de 96 pozos de ELISA de alta afinidad toda una noche a 4°C en los pozos control, únicamente 200µl de la solución de bicarbonatos pH=9.3, mientras que, en los demás pozos, por triplicado, 198 µl la misma solución amortiguadora de bicarbonatos y los plasmas de donador dil. 1:500 (2µl de plasma de donador). A la mañana siguiente se realizaron lavados con solución de lavado, PBS-Tween-20 0.05% pH=7.4 (2x5 min) en agitación rotatoria a temperatura ambiente, y se retiró el exceso del sobrenadante y, a continuación, se bloquearon los pozos con 200 µL de solución de leche descremada (0.05g de leche por 1mL PBS-T) durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Más tarde se repitieron los lavados y se añadió en los pozos 200 µl de la solución de estreptavidina-HRP a diferentes diluciones, durante 1 hora. Se repitió el lavado de los pozos y se agregaron 100 µl de ABTS a todos los pozos, inmediatamente se protegieron los pozos de la luz y se mantuvo la placa sellada en agitación de 30-40 min. Por último, se leyó la placa c/10 minutos a 405 nm con corrección de 650 nm, en el espectrofotómetro EPOCH (BioTeck).

Se realizó de manera similar otro ensayo para la estandarización inicial del anticuerpo Anti-IgG biotina humano. Nuevamente, se dejó incubar 198 µl de la solución amortiguadora de bicarbonatos pH 9.3 y los plasmas de donador diluidos a 1:500 (2µl de plasma de donador) toda una noche a 4°C; a la mañana siguiente

se realizaron lavados con 100 μ l de solución de lavado: PBS-Tween-20 0.05% pH 7.4 (2x5 min) en agitación rotatoria a temperatura ambiente, y se retiró el exceso del sobrenadante. A continuación, se bloquearon los pozos con 200 μ L de solución de leche descremada (0.05g de leche por 1mL PBS-T) durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Se realizaron los lavados y se prepararon las diferentes diluciones del anticuerpo en solución de bloqueo (leche descremada). Posteriormente se colocaron 200 μ l a diferentes diluciones del anticuerpo secundario IgG acoplado a biotina a los pozos incubando por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se repitió el lavado de los pozos y se procedió a colocar la estreptavidina. En base a los resultados obtenidos (mostrados en la sección de Resultados), se seleccionó la dilución de 1:3,000 para estreptavidina-HRP (R & D systems), agregando a cada pozo 200 μ l, dejando agitar por 1 hora más a temperatura ambiente.

Finalmente, se repitieron los lavados y pasado ese tiempo se agregaron 100 μ l de ABTS cubriendo la placa de la luz y posteriormente se puso en agitación rotatoria por 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizó la lectura de las densidades ópticas a la misma longitud de onda (405 y 650 nm). Con el propósito de garantizar la reproducibilidad en el sistema, cada ensayo se realizó por triplicado. En base a los resultados de la estandarización inicial para estreptavidina-HRP y para el anticuerpo anti-IgG humano acoplado a biotina mostrados en la Figura 7, se determinó la dilución de estreptavidina-HRP de 1:3000 y de 1:2,000 ideal para anti-IgG humana-Biotina, ya que el fabricante sugiere utilizarlo a un rango amplio de dilución (1:20,000-1:400,000).

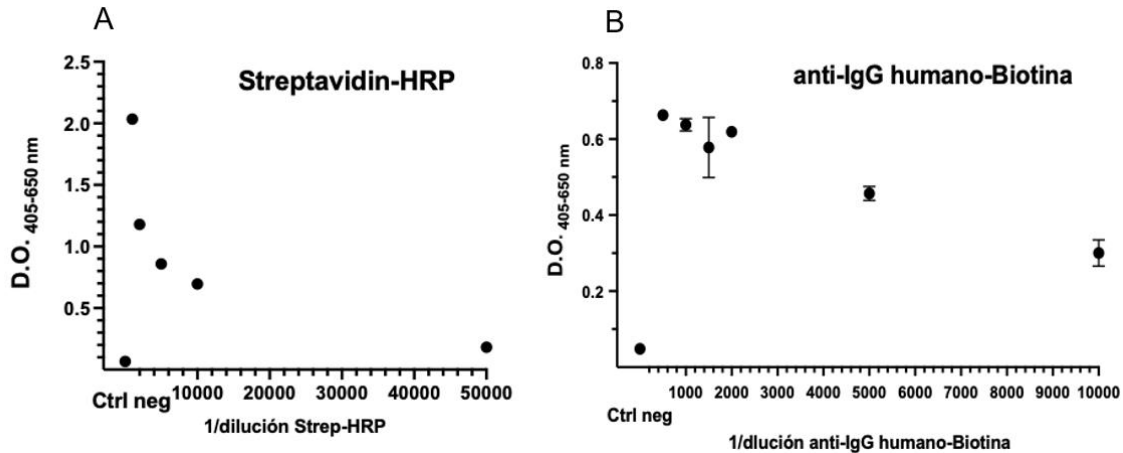


Figura 7. Estandarización inicial de las condiciones del ELISA para inmunorreactividad péptido citrulinado.

A. Ensayo de diferentes diluciones de estreptavidina-HRP (R & D systems), (1:1,000 a 1:50,000). **B.** Ensayo con anti-IgG humano-Biotina a diferentes diluciones, (1:500 a 1:10,000). Se determinó a la densidad óptica de 405 nm con corrección a 650 nm.

Posteriormente se evaluaron diferentes diluciones de los plasmas de pacientes. Para esto se evaluaron las diluciones 1:20, 1:40, 1:80, 1:100, 1:400, 1:600, 1:800 y 1:1000. En base a los resultados obtenidos se decidió seleccionar la dilución 1:800, ya que a esa dilución aún se tenía una Densidad Óptica idónea.

Por otro lado, la última modificación al ensayo de ELISA fue el cambio del agente bloqueador. En la Figura 8 se observa una comparación de los promedios de absorbancia para muestras de plasma de los primeros 6 pacientes a la dilución (1:800), entre dos condiciones de bloqueo. Los resultados empleando leche descremada al 5%, se simboliza con círculos azules, mientras que los resultados empleando BSA al 1.5% están representados con un cuadro rojo y las barras color gris. Dado que se obtuvo un incremento significativo en las lecturas de densidad óptica y un menor ruido de fondo, se prefirió conservar el bloqueo con BSA al 1.5%.

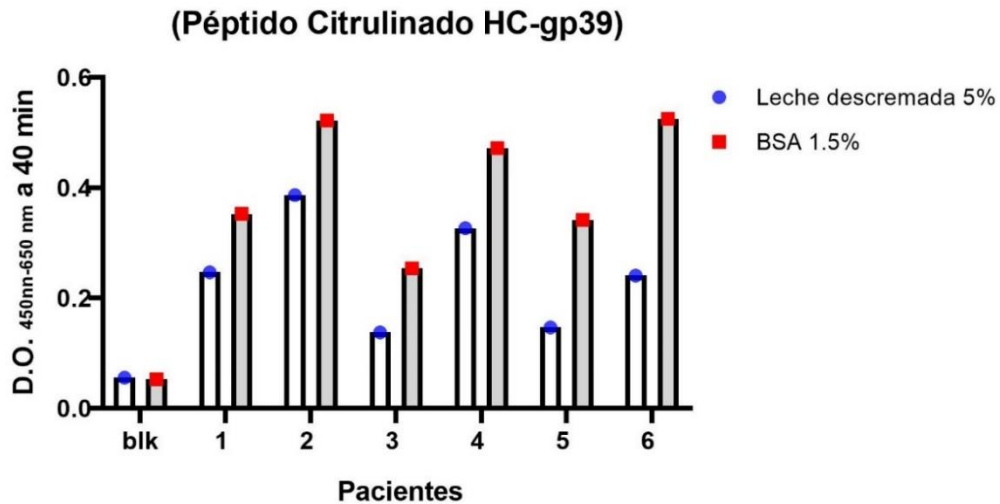


Figura 8. Comparación entre condiciones modificadas: Sol. bloqueo (BSA 1.5%, leche descremada 5%) contra condiciones basales.

De tal manera que, el procedimiento definitivo del ELISA indirecto para determinar la inmunorreactividad específica para el péptido citrulinado quedó de la siguiente manera:

- 1) Se incubaron 100 ng del péptido citrulinado y control (no citrulinado), en 200 μ L amortiguador de carbonatos, pH 9.3, durante toda una noche a 4°C.
- 2) Al día siguiente, los pozos se lavaron con PBS-Tween-20 0.1%, pH 7.4 (3 veces x5 min) y se bloquearon los pozos con 200 μ L de solución de BSA 1.5%, durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación.
- 3) A continuación, los pozos se lavaron nuevamente con solución de lavado 3 veces, y se incubaron 200 μ L de muestra de los plasmas del donador o paciente con AR a dilución 1:800 en solución de bloqueo BSA 1.5%. Si los resultados daban muy altos se repitió el ensayo con dilución 1:1600. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente y con agitación rotatoria.
- 4) Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS-T 0.1% y se agregaron 200 μ L de anticuerpo anti-IgG humano acoplado a biotina (Jackson) en dilución 1:8,000 durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 5) Después de 3 lavados con PBS-T 0.1% (3x5 min.), se agregaron a los

pozos 200 μ L de solución de estreptavidina-HRP (Jackson) a dilución 1:8000 y se dejó incubando por 1 hora a temperatura ambiente con agitación rotatoria.

6) Finalmente se realizaron los últimos 3 lavados y se agregaron 100 μ L de solución de ABTS (Merck, Sigma). La placa se protegió de la luz y a los 30 minutos se leyó en un espectrofotómetro EPOCH (BioTeck) a 405 nm con corrección a 650 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

9.4 Animales para inmunización

Se emplearon 4 ratones hembra BALB/c de 2-4 semanas de edad aproximadamente, provenientes del bioterio del IBT UNAM. Dos ratones fueron controles y los otros dos fueron inmunizados con el péptido citrulinado de la glicoproteína 39 del cartílago humano Hcgp39, a una concentración de 1mg/ml. Los ratones fueron alojados en condiciones libres de patógenos y los procedimientos que involucran animales fueron llevados a cabo de acuerdo con la Norma Oficial para manejo de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), en las instalaciones del Bioterio de la Facultad de Medicina, UAEM, con ayuda del Laboratorio de Inmunología Viral de la propia Facultad de Medicina.

9.4.1 Preparación de Antígeno con Adyuvante completo de Freund y Adyuvante incompleto de Freund.

El Protocolo del Manual de Laboratorio de Anticuerpos Monoclonal ^(98,99) recomienda usar solamente (AFC), Adyuvante completo de Freund, (Sigma) en la primera inmunización debido a que es un adyuvante muy irritante para el animal y está compuesto por una suspensión de micobacterias, aceite mineral e hidróxido de aluminio; siendo un adyuvante que induce respuesta inmune fuerte e inflamación localizada y molestias en el lugar de inyección, por lo que recomiendan manipularlo con equipo de protección (guantes, gafas) con extremo cuidado, para evitar contacto con las mucosas. La proporción entre el antígeno y el adyuvante en el primer reto

fue 1:1, v/v.

La primera mezcla fue preparada en una jeringa de insulina. Se tomaron 300 μ L de una alícuota de HC-gp39 citrulinado + 300 μ L de AFC. La mezcla se agitó en vortex por 35 minutos a 3.5 rpm. Lo mismo fue repetido para las inmunizaciones posteriores, pero sustituyendo el adyuvante AFC, (Sigma) por IFA (Adyuvante Incompleto de Freund, Sigma) y modificando la dosis del péptido citrulinado de 50 μ g a 30 μ g.

9.4.2 Inmunización con el péptido

Los dos animales experimentales fueron inmunizados vía subcutánea bajo el siguiente esquema (ver Tabla 1). Posterior a la primera inmunización con antígeno, se realizaron 3 retos correspondientes a los días 15, 30 y 54 según lo recomendado en el Protocolo del Manual de Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales⁽⁹⁹⁾. Al momento de realizar la administración subcutánea, se verificó, en los animales, la presencia de un granuloma en el sitio de la administración del péptido. Por otro lado, los ratones control, sólo fueron inmunizados con solución de PBS pH 7.4.

Tabla 1. Protocolo de inmunización con péptido citrulinado.

Día 0	Día 15	Día 30	Día 54
19-oct-2022	04-nov-2022	18-nov-2022	12-dic-2022
Inmunización 0	Reto 1	Reto 2	Reto 3
Dosis: 50 μ g	Dosis: 30 μ g	Dosis: 30 μ g.	Dosis: 30 μ g.
Adyuvante: FCA, Sigma	Adyuvante: IFA, Sigma	Adyuvante: IFA, Sigma	Adyuvante: IFA, Sigma
300 μ L de "HC-gp39" citrulinado + 300 μ L deFCA.	125 μ L de "HC-gp39" citrulinado + 125 μ L PBS pH 7.4 + 250 μ L de IFA.	75 μ L de "HC-gp39" citrulinado + 175 μ L PBSPH 7.4 + 250 μ L de IFA	75 μ L de "HC-gp39" citrulinado + 175 μ L PBSPH 7.4 + 250 μ L de IFA

9.4.3 Obtención de suero preinmune para monitoreo y sangrado a blanco

Antes de la inoculación del antígeno, a cada ratón se le extrajo de forma aséptica sangre de la cola (8-10 gotas de sangre). A continuación, la sangre se centrifugó por 8 minutos a 8000 rpm para separar el suero y se transvasó a un tubo nuevo. Las muestras se almacenaron a -20°C.

Al final de la inmunización, los ratones se sangraron a blanco por punción cardiaca, no se empleó ningún anestésico durante el procedimiento. A los ratones se les sacrificó por dislocación cervical, e inmediatamente cuando el animal orinó se realizó la punción para obtener el mayor contenido de sangre del ratón con una jeringa aprovechando los últimos latidos del animal, evitando el área de los pulmones; sin embargo, en casi todos los animales, se les tuvo que diseccionar el pecho para poder extraer más volumen de sangre.

Una vez obtenida la sangre, se centrifugaron las muestras de igual manera a 8000 rpm por 8 minutos. Aproximadamente se obtuvieron 500 µl de suero del R1 y 300 µl de suero del R2 inmunizado. De los ratones control, se obtuvieron aproximadamente 500 µl de suero para cada ratón.

Posteriormente, se hicieron alícuotas, y se resguardaron a -20°C y otras a 4°C para su uso inmediato. Por otro lado, otras de estas alícuotas del suero hiperinmune fueron utilizadas para realizar las estandarizaciones de inmunoensayos de Western Blot.

9.5 Estandarización ELISA indirecta para medir antisuero de ratón reactivo al péptido citrulinado.

Con el propósito de dar seguimiento a los niveles de antisuero selectivo, se estandarizó un nuevo protocolo de ELISA indirecto para el suero de ratones en contra del péptido citrulinado. Como en el caso del ELISA para determinar la inmunorreactividad del suero humano, aquí también se realizaron modificaciones seriadas con cada uno de los reactivos hasta alcanzar un protocolo reproducible y sensible. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Al final el procedimiento establecido fue el siguiente:

- 1) Incubación 100 ng de péptido citrulina/arginina, en solución de bicarbonatos a 4°C por toda una noche.
- 2) A la mañana siguiente se realizaron 3 lavados con solución de lavado PBS-T 0.1%. El bloqueo de la placa fue con BSA al 2% por 3 horas a temperatura ambiente.
- 3) Después se añadieron 200 µL de suero de ratones control y experimentales a una dilución de 1:200 y se lavó a los pozos con 4 lavados con solución de lavado en agitación por 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Posteriormente se agregaron 200 µL de anticuerpo anti-IgG ratón acoplado a HRP en dilución 1:750 de BSA al 2%, durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 6) Finalmente, se agregan 100 µl de solución de ABTS (Merck/Sigma) a todos los pozos y la placa se leyó a 405nm y con corrección a 650 nm a los 30 minutos.

9.6 Evaluación de líquido sinovial de pacientes

Para la determinación del reconocimiento de proteínas citrulinadas de biopsias de pacientes, se empleó el biobanco de muestras de líquido sinovial proveniente de estudios de nuestro grupo de investigación, almacenadas a -75°C, pertenecientes a pacientes del Hospital General de México (2007-2010). Inicialmente, se descongelaron alícuotas de 1ml que previamente evidenciaron tener mayor concentración de proteínas (método de Bradford) y se almacenaron a -20°C. Después, se procedió a agregar los inhibidores de proteasas PMSF y EDTA, así como azida de sodio 0.1% y, posteriormente, fueron almacenadas a 4°C. Una vez preparadas las alícuotas, se centrifugaron y se determinó la concentración de proteína, mediante la técnica de Bradford.

9.7 Análisis por SDS-PAGE y western blot

Para comprobar la estabilidad de las proteínas contenidas en las muestras de líquido sinovial se evaluaron por la técnica de SDS-PAGE desnaturizante y en condiciones reductoras, empleando geles de poliacrilamida al 15%, 1 mm de grosor y 10 carriles y empleando condiciones estándares para su migración. Todos los ensayos se realizaron con 15 µg de proteína total por carril. Para su detección, los geles fueron teñidos por la técnica de azul de Coomassie y, posteriormente, por la técnica de nitrato de plata.

En base a ensayos de dot blot, la dilución a emplear para los ensayos fue de 1:2000 del anticuerpo anti-IgG de ratón-HRP y de 1:5000 para el suero hiperinmune de ratón. Para los ensayos de western blot, debido a la reacción cruzada con las bandas de la cadena pesada de inmunoglobulinas se modificó la electroforesis para realizarse en condiciones no reductoras (en ausencia de b-mercaptoetanol).

9.8 Análisis de datos y estadístico

Para todos los ensayos de ELISA se emplearon medidas de tendencia central y los experimentos fueron realizados por triplicado. Asimismo, se realizaron pruebas de reproducibilidad entre ensayos y se empleó un control de muestra para verificar la reproducibilidad de los ensayos. Como se describe en cada caso, se determinó la D.O. a 405 nm, corregida con la D.O. a 650 nm. Al inicio de las estandarizaciones de los ensayos ELISA entre pacientes y donadores se seleccionó un control inter-ensayo para utilizarlo durante todo el proceso de análisis de datos. De manera que, se homogenizaron todos los datos en Excel por el valor transformado del control interno del sistema.

Para la determinación de la inmunorreactividad para el péptido citrulinado se obtuvo el cociente del promedio de la D.O. para cada paciente para el péptido citrulinado entre el promedio de la D.O. del mismo paciente para el péptido control. Se consideró como valor de inmunorreactividad positiva un valor superior de 1.

Para el análisis demográfico de la cohorte de pacientes, se utilizó análisis estadístico descriptivo con medidas de tendencia central; para el análisis de la

distribución de datos y verificar la normalidad de la muestra de datos entre pacientes inmunorreactivos y no inmunorreactivos al péptido se empleó la prueba de Shapiro Wilk y la prueba de Kolmogorov-Smirnov, para evaluar la similitud entre dos conjuntos de datos independientes.

Además, se determinaron diferencias entre grupos y los datos categóricos mediante la prueba independiente de (ji o chi2).

Un resultado fue considerado estadísticamente significativo con una $p < 0.05\%$. Los análisis fueron realizados en el paquete estadístico y Graph Pad Prisma.

10. RESULTADOS

10.1 Revisión bibliográfica y selección de los péptidos a evaluar.

Se realizó una revisión bibliográfica sistemática y continua con las palabras clave: "Citrullinated epitope", "Rheumatoid arthritis", o "citrullinated peptide" para determinar cuáles péptidos están frecuentemente reportados en la bibliografía como inmunogénicos e inmunorreactivos. Se obtuvieron 348 publicaciones a través de PubMed, de las cuales se descartaron revisiones y metaanálisis y repeticiones. Posteriormente se refinó la búsqueda en base a artículos de investigación que usaran muestras humanas (plasma, autoanticuerpos y líquido sinovial de diferentes cohortes de pacientes en particular pacientes con AR). En base a estos criterios, se identificaron 71 artículos originales para ser consultados y analizados, de los cuales 40 publicaciones en común contenían secuencias de péptidos citrulinados de interés inmunogénico en modelos *in vivo* e *in vitro*.

Posteriormente las secuencias fueron verificadas en motores de búsqueda *UniprotSwissProt* y (<https://www.expasy.org/resources/uniprotkb-swiss-prot>) para corroborar si dichas secuencias de aminoácidos eran las correctas. Datos mostrados en Anexo 2. Además, se verificó su peso molecular; punto isoeléctrico y polaridad (Anexo3).

Posteriormente se generó una Tabla concentradora de información de los 6 péptidos propuestos en el proyecto. En la Tabla 2, como ya se mencionó se muestran los 6 péptidos seleccionados de interés para este estudio. Estos péptidos destacan porque constituyen epítomos aparentemente no presentes en estuches comerciales en el mercado y que, por lo tanto, podrían proporcionar información novedosa sobre el perfil del citrulinoma de los pacientes con AR.

En el Anexo 3 y Anexo 4, se presentan todos los datos de las proteínas de las que se seleccionaron los péptidos y las características bioquímicas de las secuencias elegidas, además de criterios en común que tuvieron esas secuencias revisadas de publicaciones originales.

Tabla 2. Listado de Secuencias de péptidos candidatos.

Autores	Proteína	Secuencia Citrulina	Peso Molecular
Hill2008; Joshua2016; Law2012	Fibrinógeno α (31-50)	GGGVcitGPRVVEcithQSACKDS	2097.32 Da
Hill2008; Joshua2016; Khatri2020; Law2012	Fibrinógeno α (79-91)	QDFTNcitINKLKNS	1578.76 Da
Brink2013; Ioan-Facsinay2008; Boman2019	Fibrinógeno β (36-52)	NEEGFFSAcitGHRPLDKK	1989.19 Da
Whittingham2017; Burkhardt2002	Colágeno tipo II (360-373)	GAcitGLTGcitPGDAGP	1283.32 Da
Becart202; Law2012; Markovics2016	Aggrecan (84-103)	VVLLVATEGcitVcitVNSAYQDK	2219.55 Da
Baeten2004	Glicoproteína 39 del cartílago humano (HCgp39) (263-275)	PTFGcitSFTLASSET	42,625 Da

Como antes mencioné, por cuestiones de desarrollo de proyecto y por ser secuencias peptídicas innovadoras, se decidió reducir la síntesis de péptidos a sólo 3 de ellos: Aggrecan (84-103), Glicoproteína 39 del cartílago humano (HCgp39) (263-275) y Fibrinógeno α (31-50), para lo cual se realizó el pedido con la empresa *Genscript* (<https://www.genscript.com>), en diciembre 2021. Sin embargo, por problemas técnicos tuvimos que reducir nuestro proyecto a la evaluación del péptido HCgp39 en su estado natural y citrulinado.

10.2 Descripción de panel de plasma de pacientes para evaluación

En la Tabla 3 se muestran las características demográficas, datos serológicos y farmacológicos del panel de muestras de plasma de los pacientes con AR, que se utilizaron para estudiar el reconocimiento del péptido HCgp39.

Tabla 3. Datos demográficos, serológicos y farmacológicos de pacientes con AR.

VARIABLES	n=65
Género (Mujer, n) (%)	63 (97)
Edad en años, media \pm DE	49.4 \pm 12
IMC kg/cm ² , mediana [IC,95%]	25.3 [19.2-33.8]
Tiempo de evolución de la enfermedad (años), mediana [IC,95%]	10 [3-30]
DATOS SEROLÓGICOS	
DAS28, media \pm DE	3.8 \pm 1.2
aCCP, mediana [IC,95%]	162.6 [5-200]
PCR, mediana [IC,95%]	3.3 [0.68-66.7]
VSG mm/hr, media \pm DE	28.7 \pm 12.4
FR UI/ml, mediana [IC,95%]	165 [5.8-1640]
FR seropositivo n, (%)	53 (85.5)
DATOS FARMACOLÓGICOS	
Uso de Glucocorticoides, n (%)	55 (85)

IMC: índice masa corporal: (18.5-24.9: normal, 25-29.9: sobrepeso, <30: obesidad); n: número de eventos; DE: desviación estándar; IC: intervalo de confianza al 95%; DAS28: puntaje de actividad clínica (<2.8: Remisión; 2.8-3.2: Leve; 3.2-5.1: Moderada; >5.1: Actividad alta); aCCP: anticuerpo anti-péptido cíclico citrulinado (>20 UR/ml: positivo EUROINMUN*); PCR: Proteína C Reactiva: (<10mg/dl: normal, >10mg/dl: alto); VSG: velocidad de sedimentación globular(valor en mujeres:0-29mm/h); FR: título de factor reumatoide (15-20UI/ml: positivo).

En total fueron 65 las muestras de pacientes con diagnóstico de AR que nos fue proporcionado de un proyecto previo (protocolo "ANDAR", 2018-2019, Cuernavaca, Morelos, SSM-Facultad de Farmacia) y que se mantuvieron a -80°C desde su colecta hasta la actualidad. El panel de plasmas corresponde a muestras de 63 mujeres (97%) y sólo de 2 hombres (3%). Los pacientes incluidos en la base de datos presentaron una edad promedio de 49.4 ± 12 años y un tiempo de evolución de enfermedad de 10 [3-30] años. Además de un índice de masa corporal (IMC) fue de $25.3 [19.2-38.8]\text{kg/cm}^2$, sugiriendo que los pacientes tienen sobrepeso.

Con respecto a sus datos serológicos, se aprecia un nivel alto de VSG (28.7 ± 12.4 mm/hr) y la mediana de Proteína C Reactiva (PCR), de los pacientes fue del 3.3. En base a la actividad clínica de la enfermedad articular (DAS28), presentaron un puntaje promedio de 3.8 ± 1.2 , representando una actividad moderada de la enfermedad de acuerdo con el sistema de clasificación de ACR/EULAR 2010. Todo esto sugiere que los pacientes cursan por un proceso inflamatorio significativo, por lo que el 85% de los pacientes se encuentran en tratamiento con Glucocorticoides.

En cuanto a biomarcadores de autoinmunidad, pudimos observar que la frecuencia de FR seropositivos fue alta en el 85% de los pacientes y adicionalmente se hizo una categorización de los pacientes en base a su seropositividad para aCCP, resultando que 70% de los pacientes lo fueron.

Es evidente el título de autoanticuerpos aCCP, ya que los niveles fueron de $162.6 [5-200]$, un puntaje alto en los pacientes, según los parámetros del fabricante. Por otro lado, los niveles promedio de factor reumatoide fueron altos de $165 [5.8-1640]$ UI/ml.

10.3 Inmunorreactividad péptidos contra plasma de pacientes

Una vez estandarizada la técnica de ELISA indirecto con plasma de pacientes y donadores, para medir la inmunorreactividad específica, a través de un sistema sensible (D.O entre 0.5 a 2.0 para 100 ng de péptido citrulinado) en ensayos por triplicado con evaluaciones con controles negativos y control inter-ensayo; se evaluaron las inmunorreactividades de las muestras de los pacientes. Es necesario aclarar que no se encontró plasma del paciente 12 desde que las muestras fueron descongeladas, por lo que la secuencia presentada salta del paciente 11 al paciente 13.

Con el propósito de destacar la respuesta diferencial del plasma de los pacientes a los dos tipos de péptido (citrulinado y control), la Figura 9 presenta la relación numérica entre el nivel de reactividad al péptido citrulinado, en relación con la reactividad al péptido control. En estos términos, una mayor reactividad por el péptido citrulinado significará obtener un valor mayor a 1.0, mientras que mayor reactividad al péptido control significará un valor menor de 1.0. En la misma Figura 9, se muestra que de 65 muestras analizadas 41 de ellas (63%), mostraron mayor detección para el péptido citrulinado.

Por su parte, la D.O. promedio de ensayos ELISA indirecto por triplicado de todos los 65 pacientes fue de 1.053 ± 0.192 , mostrando una distribución normal (IC, 95% 0.61-1.34). En términos generales, esto significaría que el plasma de pacientes con AR reconoce preferentemente al péptido citrulinado, sobre el péptido control, lo cual implicaría que sería pertinente desarrollar una herramienta inmunológica específica en contra de este epítipo, toda vez que es un evento de autoinmunidad frecuente en los pacientes con AR mexicanos.

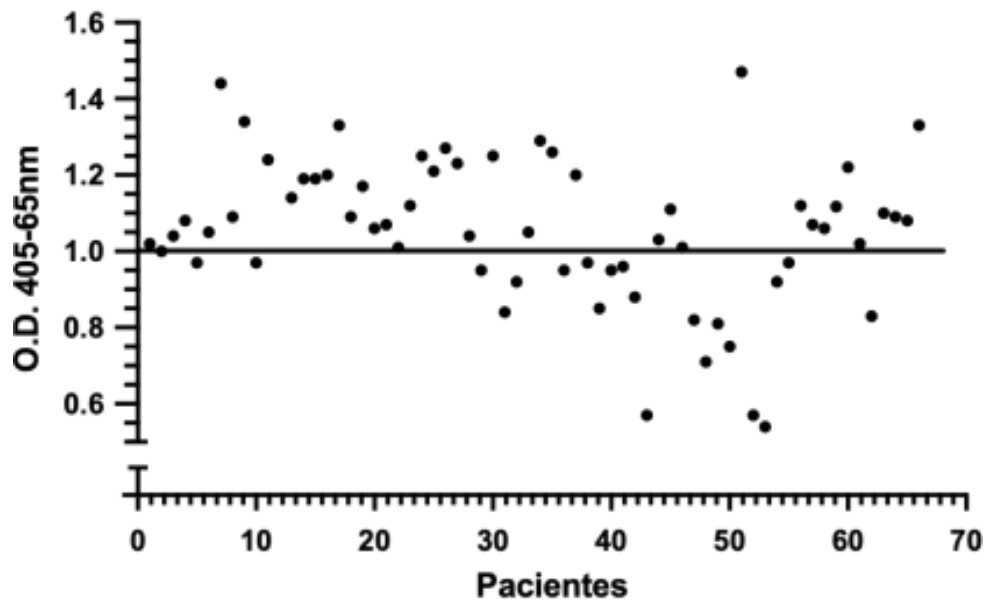


Figura 9. Inmunorreactividad comparativa entre péptido citrulinado y control (Arg) por ensayo de ELISA indirecto en plasmas de pacientes.

Es evidente que la modificación de un solo residuo de Arg por citrulina del péptido sintético, significa un reconocimiento diferente entre los sueros de pacientes, sugiriendo la presencia de autoanticuerpos en contra de este antígeno por parte de los pacientes.

Hasta donde sabemos, ésta es la primera vez que se evalúa el reconocimiento en el suero de pacientes mexicanos, por lo que el desarrollo de un anticuerpo específico de este antígeno podría ser de utilidad para el estudio del citrulinoma. Cabe destacar que este epítipo no se ha incluido en estuches comerciales para el diagnóstico de la autoinmunidad, por lo que se puede contribuir a la obtención de resultados originales.

10.4 Relación entre variables clínicas e inmunorreactividad.

Se puede observar en la Tabla 4 que la gran mayoría de las variables demográficas (edad, género, estatura, peso, IMC), clínicas (antecedentes de AR, índice aterogénico, dislipidemia, etc.) y de moléculas de sangre (PCR, NFR, IL-6, leptina, insulina, MCP-1) fueron similares entre ambos grupos de pacientes.

Debido a su naturaleza autoinmune es necesario hacer una particular mención acerca del análisis sobre los niveles de factor reumatoide y anticuerpo anti-péptido citrulinado cíclico (aCCP) y es que, aunque el título de FR fue mayor en los pacientes inmunorreactivos al péptido citrulinado, la variación entre los pacientes del grupo no permite alcanzar significancia estadística. Algo similar sucede al comparar los títulos de aCCP, puesto que los niveles son superiores en el grupo no inmunorreactivo, pero no se alcanza diferencias estadísticas.

El 36.6% de los pacientes que tuvieron reconocimiento por el epítipo citrulinado, tienen antecedentes heredofamiliares de la enfermedad y el 78.6% de estos pacientes que fueron inmunorreactivos usan glucocorticoides.

Por otro lado, es interesante observar que los niveles de glucosa en ayunas fueron significativamente superiores en los pacientes inmunorreactivos al péptido citrulinado, sin embargo, no fue estadísticamente significativo.

Por su parte, los parámetros del conteo articular (número de articulaciones dolorosas e inflamadas) fue significativamente menor en los pacientes inmunorreactivos al péptido citrulinado ($p=0.011^*$ y 0.027^* , respectivamente).

Aunque tanto el médico como el paciente reportaron una calificación global de dolor menor en pacientes inmunorreactivos al péptido, esto no alcanzó significancia estadística. Finalmente, resulta sorprendente observar que los 3 índices que se emplean para medir la actividad clínica de los pacientes con AR (DAS28, CDAI y SDAI) fueron diferentes entre ambos grupos de pacientes. A ese respecto y, en congruencia con las diferencias observadas en el conteo articular, se observa que la actividad clínica fue menor en el grupo de pacientes cuyo plasma fue reactivo a la presencia del péptido con citrulina, en comparación al péptido control. Es indudable que se requiere un análisis más detallado para poder sugerir una explicación a esta diferencia entre los grupos de pacientes.

Tabla 4. Comparación entre pacientes en base a inmunorreactividad al péptido.

Variable	No Inmunorreactivo	Inmunorreactivo	p
N	24	41	
Edad, años (DE)	48.3(12.0)	51.4(12.9)	0.336 ^a
Mujeres, n (%)	23 (95.9)	40 (97.6)	0.99 ^b
Antecedentes AR, n (%)	5 (20.8)	16 (36.6)	0.267 ^b
Uso de Glucocorticoides, %	86.9	78.6	0.737 ^b
No. articulaciones dolorosas, mediana [IC,95%]	3 [0-27]	1 [0-8]	0.011 ^{b*}
No. articulaciones inflamadas, mediana [IC,95%]	5 [0-14]	2 [0-9]	0.027 ^{b*}
VSG, mm/h, media (DE)	28.1 (13.2)	29.0 (12)	0.81 ^a
PCR, mg/L, mediana [IC,95%]	3.3 [7-52]	3.3 [0.4-31]	0.52 ^b
VAS médico, mediana [IC,95%]	17.5 [0-61]	10 [0-50]	0.057 ^b
VAS paciente, mediana [IC,95%]	47 [0-100]	11 [0-80]	0.006 ^{b*}
DAS28, media (DE)	4.50 (1.23)	3.44 (0.98)	0.0004 ^{a****}
CDAI, mediana [IC,95%]	23.3 [1-48]	6.0 [0.14-24]	0.002 ^{b****}
SDAI, mediana [IC,95%]	23.7 [1.2-144]	6.7 [0.5-45]	0.0002 ^{b****}
αCCP, RU/ml, mediana [IC,95%]	162.6 [5-200]	156.3 [5-200]	0.79 ^b
FR, UI/ml, mediana [IC,95%]	207.4 [0.7-612]	162.8 [9-2194]	0.83 ^b
Estatura, cm, mediana [IC,95%]	151 [140-164]	153.0 [142-165]	0.55 ^b
Peso (kg, mediana [IC,95%])	61.5 [42-83]	57 [44-82]	0.33 ^b
IMC, kg/m ² , mediana [IC,95%]	26.3 [20-35]	24.6 [18-34]	0.17 ^b
Glucosa, mg/dL, mediana [IC,95%]	84.5 [76-120]	90.5 [76-208]	0.08 ^b
NGF, pg/ml, mediana [IC,95%]	2.08 [0-21]	2.08 [0-22]	0.65 ^b
IL-6, pg/ml, mediana [IC,95%]	20.2 [0.003-332]	20.2 [0.02-331]	0.25 ^b
Leptina, pg/ml, mediana [IC,95%]	9939 [124-85219]	9939 [124-85219]	0.73 ^b
MCP1, pg/ml, mediana [IC,95%]	153 [10-454]	197 [45-1202]	0.08 ^b
Insulina, pg/ml, mediana [IC,95%]	470 [44-2625]	562 [96-2871]	0.46 ^b
Índice aterogénico, mg/dL, media (DE)	3.5 (0.64)	3.3 (0.72)	0.35 ^b
Hipertrigliceridemia, %	29.2	17.1	0.35 ^b
Hiperlipidemia mixta, %	12.5	2.4	0.14 ^b
Hipercolesterolemia, %	12.5	7.3	0.66 ^b

Dislipidemia, %	29.2	21.9	0.52 ^b
-----------------	------	------	-------------------

Prueba estadística de normalidad Shapiro-Wilk; Kolmogórov-Smirnov.

N: número de eventos; DE: desviación estándar; IC₉₅: intervalo de confianza al 95%; VSG: velocidad de sedimentación globular; PCR: Proteína C Reactiva; VAS médico/VAS paciente: escala visual análoga; DAS28: puntaje de actividad clínica (<2.8: Remisión; 2.8-3.2: Leve; 3.2-5.1: Moderada; >5.1: Actividad alta); CDAI: Índice de la actividad clínica de la enfermedad; SDAI: Índice simplificado de la actividad de la enfermedad; aCCP: anticuerpo anti-péptido cíclico citrulinado (>20 UR/ml: positivo EUROINMUN*); (<10mg/dl: normal, >10mg/dl: alto); (valor en mujeres:0-29mm/h); FR: título de factor reumatoide (15-20UI/ml: positivo); IMC: índice masa corporal; NGF: Factor de crecimiento nervioso; IL-6: interleucina 6; MACP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos-1.

10.5 Inmunización de ratones.

La inmunización se describe en detalle en el apartado de Material y Métodos. Es importante mencionar que los sueros de ratones control e inmunizados fueron evaluados de acuerdo con las condiciones estandarizadas por la técnica de ELISA indirecto.

En la Figura 10, se observa la comparación de los niveles promedio de títulos de antisuero de ratón obtenidos en ensayos de ELISA indirecto con el péptido citrulinado (HC-gp 39). En el eje de las abscisas se presenta la respuesta de los sueros a diferentes tiempos de la inmunización (tiempo 0, 15, 30 y 54 días). Mientras que en el eje de las ordenadas se observa la D.O.

Los niveles de la D.O. correspondiente a los sueros de ratones inmunizados al día cero tuvieron una reactividad similar a la presente por los controles

Los niveles de la D.O correspondiente a los sueros de ratones inmunizados al día cero tuvieron una reactividad similar a la presente por los controles, sin embargo, a partir del día 15 de seguimiento se observó una reactividad significativamente mayor (D.O. cercana a 0.6; aunque la reactividad no superó el 100% de señal, de acuerdo a lo esperado para una respuesta inmune específica.

Finalmente, los niveles de DO aumentaron para el día 54. Al parecer al incrementar los retos parece observar un incremento en la DO, pero no fue muy notable cuando se comparan con los controles.

Conviene resaltar que experiencias previas de inmunización muestran una

diferencia muy grande entre la reactividad de los ratones controles contra los ratones inmunizados.

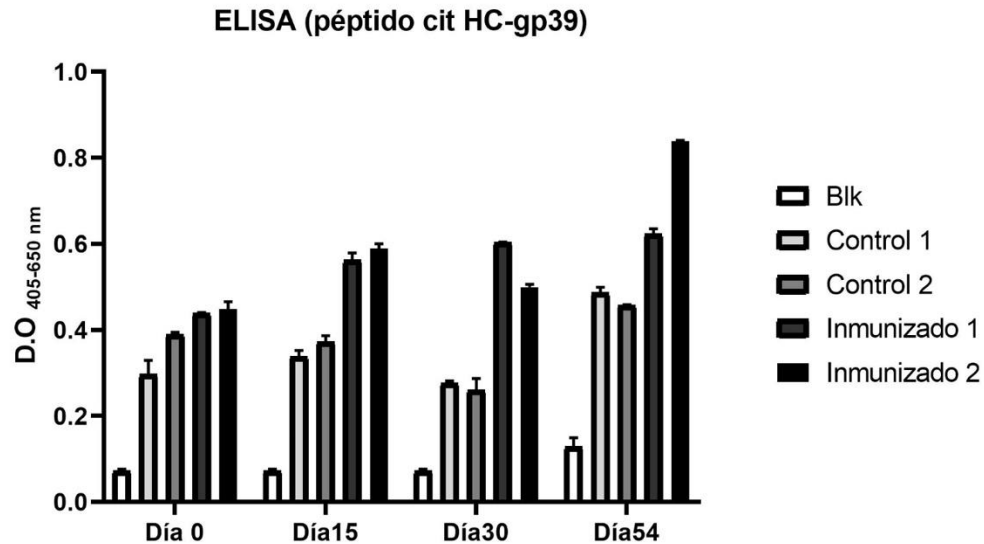


Figura 10. Niveles de reactividad del péptido Citrulinado HC-gp 39 en suero de ratones BALB/c.

Por otra parte, en la Figura 11, se observan los resultados del ensayo de reactividad de los sueros de ratones al péptido control (misma secuencia, pero Arg en lugar de citrulina). Primero hay que hacer notar que, en todos los casos, tanto en suero de ratones control como los ratones inmunizados dieron una señal ante este péptido entre (0.34 - 0.6), lo cual sugiere que la reactividad cruzada en contra del péptido no citrulinado es muy alta. Asimismo, es notable observar que la reactividad del suero de ratones control, en comparación con los inmunizados no ofreció respuestas estadísticamente diferentes.

Además, se observó en el último ensayo con el péptido control, la D.O. del suero de ratones control e inmunizados, se mantuvo aparentemente estable.

Al comparar los niveles de reactividad de los sueros control a lo largo de los 54 días de inmunización se observó un ligero incremento desde niveles menores a 0.40 (días 0 y 15), que alcanzaron (0.45) al día 54. (La línea roja, sirve de guía para visualizar los niveles de la D.O).

Por su parte, el suero de los ratones inmunizados mostró una reactividad

similar al péptido control, pero al día 30 mostró incluso se obtuvo una reactividad menor (DO 0.26), para incrementarse a nivel superior a 0.40 en el día 54.

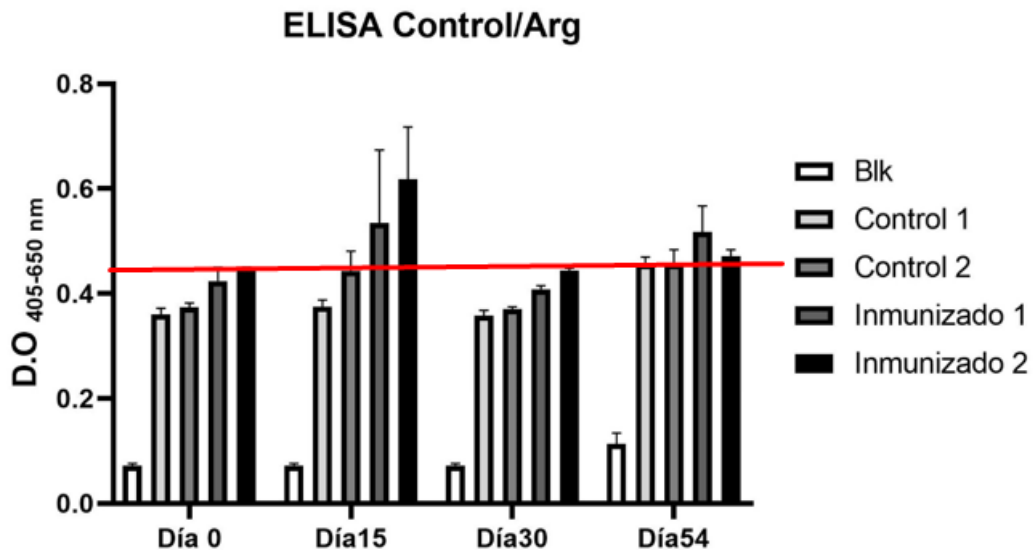


Figura 11. Niveles de reactividad del péptido control (Arg) en suero de ratones BALB/c.

10.6 Panel de muestras de líquido sinovial

Una vez estandarizadas las condiciones para correr los geles (SDS-PAGE al 15%), con 14 muestras de líquido sinovial, diluidas 1:50 y se realizó la tinción con azul de Coomassie (Figura 12). A pesar de que cada carril contenía 15 µg de la muestra de líquido sinovial, la tinción no fue tan sensible para visualizar las proteínas que están dentro del rango de nuestra proteína de interés 39-42 kDa. Por lo tanto, se procedió a realizar tinción de plata y aquí se lograron observar otras proteínas que no se visualizaron con la otra tinción, en el rango de pM de interés (Figura 13).

A partir de la visualización en los geles y de los resultados del ensayo para determinación de concentración de proteína (Bradford), se seleccionaron los líquidos sinoviales para los ensayos de western blot, correspondientes a las

muestras de los pacientes 31 y 36, sin embargo, la muestra 31 ya era muy poca para correrla en el ensayo posterior.

También se seleccionó la muestra del paciente 11, como control.

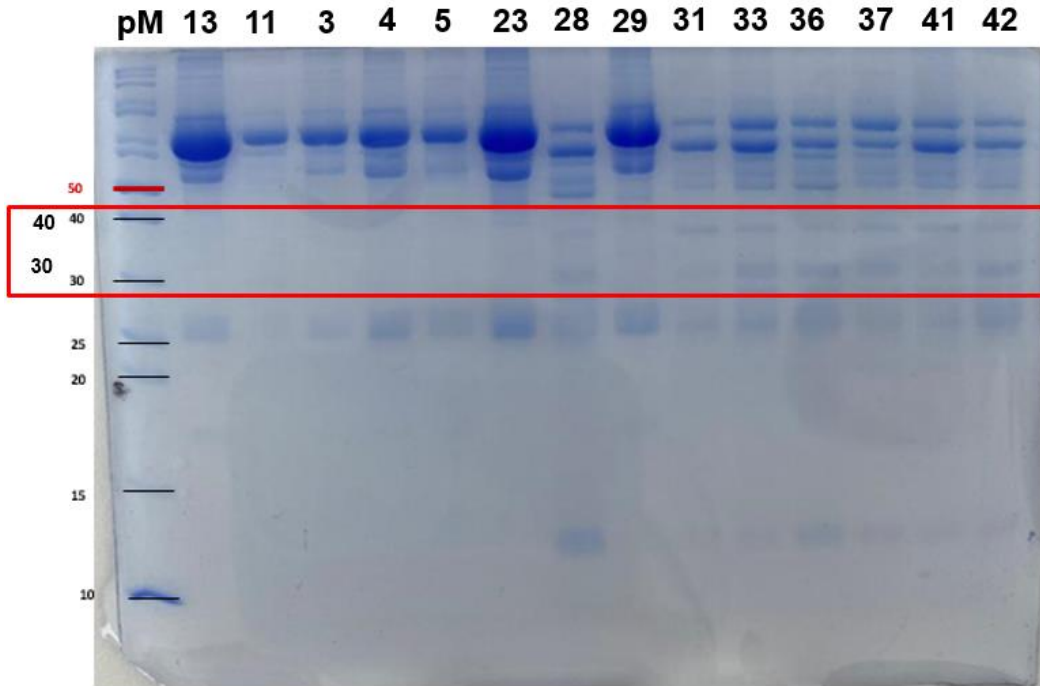


Figura 12. SDS/PAGE 15%, análisis de líquidos sinoviales (dil. 1:50), tinción con azul de Coomasie.

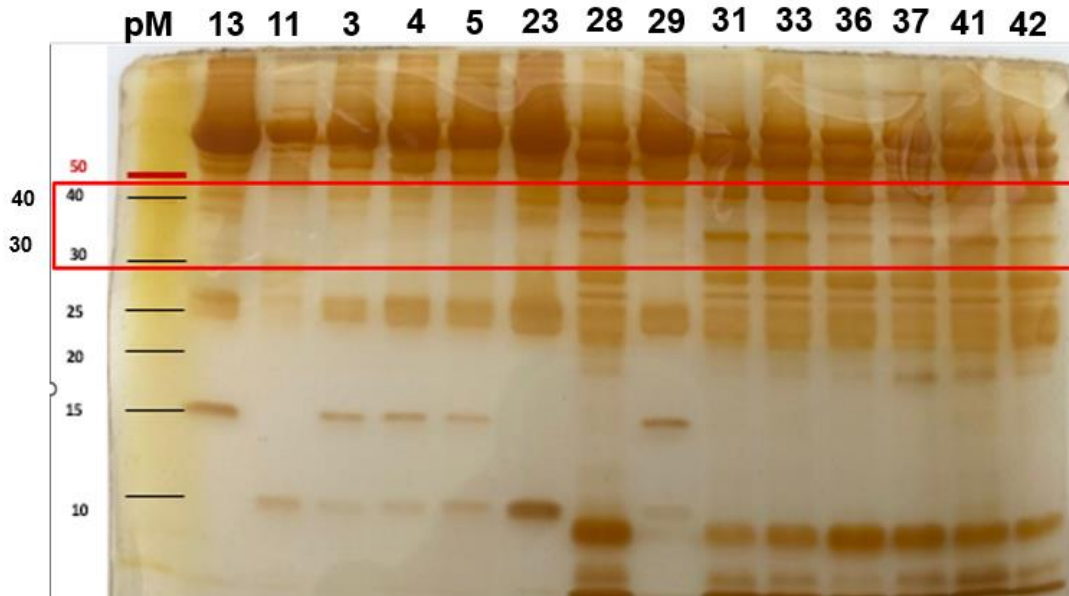


Figura 13. SDS/PAGE 15%, análisis de líquidos sinoviales (dil. 1:50), tinción de plata.

En el recuadro se pueden observar las bandas que se encuentran en el rango del pM correspondiente a la proteína de interés (39-42kDa); tomando en cuenta el marcador de pM.

10.7 Identificación de proteínas de líquido sinovial contra suero de ratón.

A continuación, se realizó un western blot. Cada carril se cargó con 10 μ g de proteínas de las muestras de líquido sinovial del paciente 36 pero no pudo observarse alguna banda específica contra el suero de los ratones inmunizados. Como última alternativa se emplearon 30 μ g por carril para cada muestra de líquido sinovial (paciente 36), la cual se cargó en 5 diferentes carriles, como se observa en la Figura 14, con la nitrocelulosa teñida con Rojo Ponceau, la tinción se realizó por 10 minutos en agitación a temperatura ambiente.

En la parte superior de la Figura 14, en la tinción, se observa que la banda prominente corresponde a la albumina humana, con un peso molecular cercano a 65 kDa. Después de desteñirlo, se cortaron en secciones cada uno de los carriles y fueron incubados con diluciones diferentes del suero de ratones inmunizados: 1:100 (carril 1), 1:200 (carril 2), 1:500 (carril 3), 1:2,000 (carril 4) y 1:5000 (carril 5). Sin

embargo, no hubo señal visible una vez revelado el experimento (parte inferior Figura14). En base a estos resultados no se puede confirmar que el suero de ratones inmunizados sea inmunoselectivo para el epítipo citrulinado y parece no ser capaz de reconocer proteínas sinoviales.

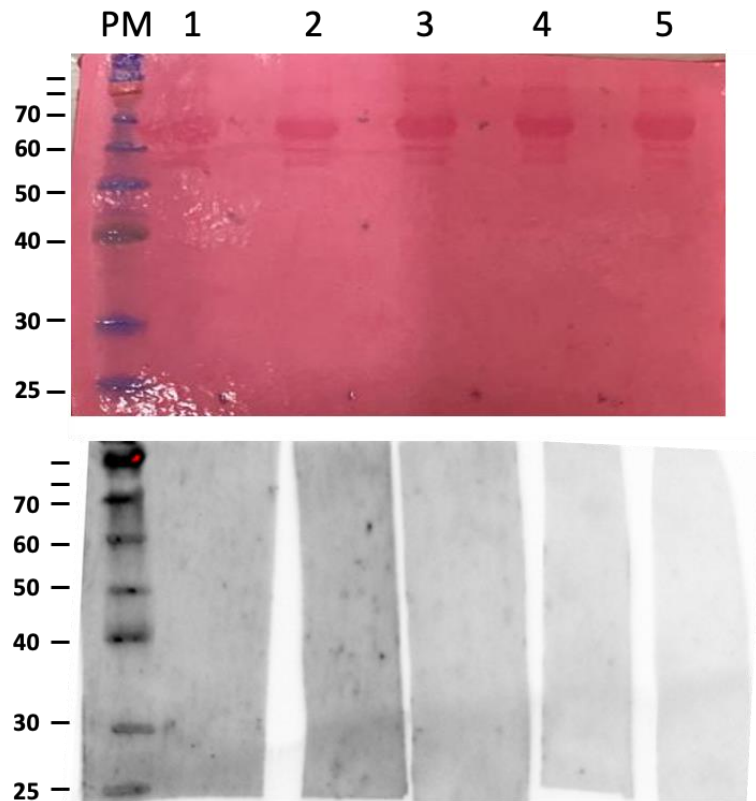


Figura 14. Ensayo de Western Blot, con muestra de Líquido Sinovial de paciente 36.

Parte superior de la imagen, se muestra la membrana con la tinción de rojo Ponceau. Se puede observar que no hubo detección visible de ninguna banda en las diferentes diluciones de los sueros de ratón inmunizado 2, sugiriendo la ausencia de epítomos que posiblemente no son reconocidos por el suero del ratón 2 inmunizado en esa muestra de líquido sinovial.

11. DISCUSIÓN

11.1 Antigenicidad del péptido citrulinado HCgp-39 (263-275) derivado de la proteína sinovial de 39 kDa.

La HCgp-39 es una glicoproteína que secretan los condrocitos y fibroblastos sinoviales, con un peso molecular entre 39 y 42 kDa, que forma parte de una nueva familia de lectinas similares a la quitinasa que parece jugar un papel activo en la defensa en contra de hongos y bacterias. Su sobreexpresión puede estar implicada en una remodelación extensa del tejido conjuntivo como en el cartílago artrítico y la membrana sinovial hiperplásica, el epitelio pulmonar, la piel o el hígado fibrótico^(100,101). Se han reportado niveles séricos elevados de dicha proteína en ciertos tipos de cáncer de mama, cáncer de colon y en pacientes con gliomas malignos, que incluso se relaciona con un mal pronóstico de la enfermedad^(102,103).

Esta proteína también parece tener un papel en la respuesta inflamatoria de las células T de tipo 2 (Th2) y la inflamación inducida por IL-13, regulando la sensibilización a alérgenos, la apoptosis de células inflamatorias, la acumulación de células dendríticas y la diferenciación de macrófagos M2⁽¹⁰⁴⁾. Además se conoce que la inoculación de HC gp-39 induce artritis en ratones BALB/c⁽¹⁰⁵⁾.

En un estudio, un epítipo con prometedora utilidad clínica, que además no está incluida en los kits comerciales de pruebas aCCP que era de la glicoproteína anteriormente mencionada “HCgp-39 263-275”, fue empleado como blanco de evaluación en muestras de membrana sinovial de pacientes con AR. Para tal efecto usaron un anticuerpo monoclonal sintetizado, llamado “12 A”, que está dirigido contra el complejo HLA–DR-04/HC gp-39 263-275 y parece inhibir las respuestas específicas de las células T *in vitro*⁽¹⁰⁶⁾. Para este estudio, emplearon muestras de biopsias sinoviales de 132 pacientes, obtenidas mediante artroscopia con aguja y la tinción por inmunohistoquímica se realizó con el AcM “12 A”. Las muestras correspondían a 65 pacientes con AR, 67 individuos con otro espondilo artropatías (espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, artritis reactiva, artritis asociada a enfermedad inflamatoria intestinal y enfermedades indiferenciadas); 21 pacientes restantes tenían osteoartritis, gota, polimialgia reumática. De las muestras, se

observó tinción con el anticuerpo monoclonal “12 A” en la membrana sinovial de 40 de 65 pacientes con AR, es decir, en el 61.5% de muestras sinoviales en comparación con solo el 3% de las muestras control que padecían diversas enfermedades inflamatorias y degenerativas ($p < 0.001$). Histológicamente, en la proximidad de los sitios de la expresión de HC gp-39, se observaron agregados linfoides (CD3 y CD1a), evidenciando la presentación del antígeno. Adicionalmente, los niveles VSG de los pacientes fueron superiores en pacientes seropositivos para AcM “12 A” en comparación con pacientes negativos (media de VSG: 38 mm/h vs 33 mm/h) respectivamente. Por otra parte, la tipificación del epítipo compartido estuvo disponible para el 65% de los 37 pacientes, es decir 24 pacientes con AR positivos para EC, se tiñeron positivamente con el AcM “12 A”; de esos 24 pacientes, 15 fueron positivos para HLA DR1*0401 y 7 positivos para HLA DR1* 0101⁽¹⁰⁶⁾. Además, conviene resaltar que la presencia de este epítipo seropositivo coincide con sinovitis grave y parece representar un autoantígeno que propició el desarrollo de la enfermedad.

Adicionalmente, empleando el mismo anticuerpo 12A, identificaron y localizaron células dentro del tejido sinovial de pacientes con AR que procesan y presentan HC gp-39 (263–275) en el contexto de los alelos HLADR--1*0401. La tinción con el marcador de células dendríticas CD1a sugieren la presencia de un fenotipo de células dendríticas. Otros tipos de células que expresan MHC de clase II, por ejemplo, células B y macrófagos, no parecen estar implicados en la presentación de este epítipo⁽¹⁰⁶⁾.

La búsqueda de anticuerpos en contra de epítipos citrulinados derivados de esta proteína podría ser una importante fuente de nuevas herramientas, no sólo diagnósticas sino incluso terapéuticas.

Aunque la proteína contiene 18 argininas en su estructura primaria, sólo 1 una de ellas ha sido identificada citrulinada potencialmente porque podría encontrarse en una región más expuesta en una región sin estructura secundaria. En base a esto, valdría la pena hacer un estudio más detallado para valorar en

estudio *in silico*, los posibles blancos de las enzimas PAD2 y PAD 4 sobre esta proteína.

Los resultados del presente estudio confirman que el epítipo citrulinado ²⁶³⁻PTFGcitSFTLASSET₋₂₇₅, derivado de HCgp-39 parece ser reconocido por la mayoría de los pacientes con AR de una cohorte reciente. Esto sugiere que la presencia de este epítipo ya sea en su forma de proteína o en su fragmento de proteína, podría haber sido empleada para la generación de autoanticuerpos en estos pacientes. Hay que hacer notar que empleando el programa de BLAST de *SwissProt* (<https://www.uniprot.org/blast/uniprotkb/ncbiblast-R20230611-153325-0652-19313225-p1m/overview>) sólo se pudo identificar una secuencia similar (91% de similitud) con la quitotriosidasa 1, lo cual nos sugiere que potencialmente no hay muchas otras proteínas en el humano que pudieran simular o ser responsables del reconocimiento específico por el plasma de los pacientes con AR.

Por otro lado, resulta además muy interesante poder dar continuidad a este estudio en el orden de conocer las razones por las cuales la actividad clínica de la AR potencialmente podría asociarse de manera negativa con la presencia de autoanticuerpos en contra de este epítipo. Una manera de sugerir este estado es considerar que los eventos autoinmunes en contra de este epítipo puedan limitar la presentación de otros péptidos potencialmente citrulinados, limitando de manera relativa su posible efecto patológico. Sin embargo, todo esto es totalmente especulativo y requiere un estudio dirigido para poder encontrar pistas para su explicación. En todo caso, lo que se puede concluir de todo esto es que la frecuencia de autoanticuerpos en los pacientes mexicanos es suficiente elevado para considerar que vale la pena realizar esfuerzos suficientes para generar herramientas inmunológicas para su monitoreo, dado que podría ser un nuevo biomarcador para esta enfermedad.

11.2 Suero hiperinmune

Como un primer intento de generar un suero específico para este epítipo, se realizó un protocolo de inmunización con el péptido soluble, sin embargo, los resultados no fueron los deseados. En ese sentido, los títulos de anticuerpo reactivo al péptido no se incrementaron a niveles esperados en una respuesta inmune específica.

Los protocolos de inmunización asumen que la presentación antigénica del sistema inmune es muy potente porque se activa la respuesta inmune innata gracias a la presencia del adyuvante completo de Freund, lo cual garantiza que las células presentadoras de antígeno realizarán la presentación y activación de células T. Sin embargo, la respuesta inmune adaptativa de nuestros ratones no parece haber sido la adecuada para generar títulos elevados de anticuerpos, sobre todo como resultado de los retos posteriores. Para explicar este efecto se puede identificar algunos motivos como la dosis del antígeno, el número de inmunizaciones o vías de administración.

Asimismo, un parámetro a considerar es la naturaleza del péptido. Diferentes estudios han mostrado que la posibilidad que un péptido pequeño y lineal por sí sólo puede generar una respuesta inmunogénica es limitado.

El protocolo recomienda que los títulos de anticuerpos deben incrementar conforme al número de inmunizaciones con el antígeno, e incluso pueden llegar a una fase “estacionaria”. Además, para realizar la fusión celular, se ha reportado en estudios previos que lo ideal es realizar otra inmunización a los ratones con 3 a 5 días de antelación por vía intraperitoneal y proceder a fusionar células plasmáticas productoras de anticuerpos con la línea celular del mieloma (SP2/0-Ag14) ^(98,99).

Por otra parte, los anticuerpos IgG pueden tener su pico máximo a los 3 meses, por eso se pudo haber obtenido un falso positivo en los títulos de los anticuerpos pertenecientes a los ratones, mientras que los anticuerpos IgM puede tener su pico en los primeros 15 días después del contacto con el AG. Además hay que recordar

que la estructura de los anticuerpos puede ayudar a determinar que tanta afinidad tendrán por los epítomos⁽¹⁶⁾.

12. LIMITACIONES

El proyecto tiene varias oportunidades de mejora respecto a las técnicas experimentales. Desafortunadamente, los experimentos de este proyecto comenzaron a finales del año 2021. Debido a la pandemia provocada por SARS-Cov-2, este estudio tuvo muchos contratiempos debido a las medidas de distanciamiento físico y normativas de seguridad para protección que se implementaron (primer medio año del posgrado fue en línea). Adicionalmente, debido a problemas técnicos, ya sea de la compañía donde se envió a realizar la síntesis de péptidos y los problemas locales para la importación de reactivos para investigación, se tuvo que limitar este estudio a la evaluación de un sólo péptido citrulinado.

Otra limitante, fue la imposibilidad de tener a tiempo el péptido acoplado con una proteína acarreadora. Lo recomendado era conjugar este péptido con una proteína de acarreamiento como “KLH” o como alternativa usar plasma de cabra, ya que se recomienda usar cualquiera de los dos en combinación con el péptido, para generar una respuesta inmunológica humoral duradera en los ratones y por lo tanto obtener un mejor rendimiento en los títulos de anticuerpos y una mejor calidad de anticuerpos específicos una vez estimulados los linfocitos B del ratón.

Este reactivo llegó al laboratorio 13 de la Facultad de Farmacia con un retraso de 5 meses, cuando ya se había concluido el periodo de mi estancia de investigación, por lo que quedó fuera de las posibilidades usarlo para iniciar el protocolo de inmunización.

Por otra parte desde que se estandarizaban los WB, por Dot Blot, notamos que había pegado inespecífico, sugiriendo que los anticuerpos del suero hiperinmune no se pegaban a las proteínas de ratón inmunizado con el péptido, ya que hubo una banda más intensa en el suero del ratón control, de manera que se modificaron las condiciones para estandarización del ensayo y además las muestras de suero hiperinmune de los ratones fue muy poca cantidad la que se rescató, incluso algunas alícuotas de 100 µl se terminaron.

Desde luego, todo esto fue determinante para las conclusiones del proyecto ya que, en los ensayos de WB posteriores ya no hubo detección de los anticuerpos de ratón hacia los epítomos de la proteína HCgp-39 en las muestras de los líquidos sinoviales de pacientes con AR. En ese sentido, hay una probabilidad de que la respuesta que se estimuló en el sistema inmune de los ratones no fue la suficiente para generar una respuesta inmunitaria humoral.

13. CONCLUSIONES

La inmunorreactividad al péptido citrulinado de la proteína HC-gp39 (263-PTFGcitSFTLASSET-275), fue positiva en el 63% de los pacientes analizados, lo cual sugiere que pueda tratarse de un epítipo que frecuentemente se encuentra en el tejido que sufre una remodelación debido a algún daño y podría participar como neoantígeno para la generación de respuesta autoinmune en los pacientes mexicanos, demostrando así la importancia de explorar el citrulinoma en los pacientes.

Resulta sorprendente que los pacientes que presentaron inmunorreactividad a este epítipo citrulinado son quienes mostraron una actividad clínica estadística menor, en comparación de los pacientes no inmunorreactivos. Esto requiere un análisis más detallado para evaluar posibles confusores. En todo caso, la inmunorreactividad al péptido citrulinado, parece no mostrar tener impacto en la actividad o severidad de la enfermedad.

Por otro lado, después de los ensayos inmunización, aunque se observaron mayor reactividad para los péptidos citrulinados en los ratones experimentales, los ensayos de western blot con el suero de los ratones no mostraron detección en contra de proteínas derivadas del líquido sinovial de pacientes con AR, sugiriendo que no hubo inmunorreactividad. Se asume que el péptido fue pequeño (14 aminoácidos) y además es lineal, lo que dificulta su capacidad para ser presentado, incluso lo que pudo haber sucedido es que las células B específicas a ese péptido, no reciben de manera eficiente la cooperación las de las células T helper.

14. PERSPECTIVAS

Este proyecto al ser un estudio exploratorio sugiere que es relevante continuar por conocer que proteínas pueden ser blanco de los autoanticuerpos de un paciente con AR, en población mexicana. De tal manera que es importante que se explore el citrulinoma de los pacientes y además se conozca la inmunorreactividad de los pacientes ante péptidos con potencial papel de neo antígenos, como fue el caso de este péptido de interés.

Originalmente el proyecto contemplaba el desarrollo de anticuerpos monoclonales, que provenían de este péptido y de otros péptidos de proteínas novedosas que no se encuentran en kits de detección, sin embargo, debido a la situación de emergencia que se vivió por la pandemia ocasionada por el SARS-Cov2, la mayoría de los experimentos se postergaron. Cabe mencionar que, el banco de plasmas de pacientes se conserva y, por lo tanto, en mejores condiciones se podría en un futuro realizar este estudio para los otros péptidos identificados por la búsqueda bibliográfica dirigida.

Por otro lado, el suero hiperinmune obtenido, pudo haber sido más eficaz y tal vez de mejor calidad si el péptido estuviera conjugado con una proteína de acarreo como lo es la KLH, por sus abreviaturas en inglés “Keyhole Limpet Hemocyanin”, la cual es una proteína gigante proveniente de la sangre de un molusco. Esta proteína tiene una gran capacidad de estimular una respuesta inmune específica y duradera en el sistema inmune del ratón y la producción de anticuerpos específicos sea más efectiva y robusta.

Además, se pueden aumentar las inmunizaciones a los ratones, ya que, por la falta de tiempo, sólo se realizaron 4 inmunizaciones subcutáneas sin una inoculación intraperitoneal, como normalmente lo recomiendan los protocolos cuando se pretenden obtener anticuerpos monoclonales por técnica la del “hibridoma”.

Vale la pena considerar un análisis para conocer el subtipo de Inmunoglobulinas que se hayan obtenido, ya que todo sugiere que los anticuerpos del suero hiperinmune en su mayoría pueden ser de naturaleza IgM.

Además, se pudiera explorar una vía a nivel celular para confirmar su mecanismo por el cual inducen la respuesta de tipo innata. También sería curioso saber si este péptido, es más específico para otro tipo de enfermedades reumáticas en pacientes mexicanos.

A pesar de eso, se obtuvieron resultados que pudieran sugerir su utilidad en futuro para un uso clínico, ya que la finalidad es obtener una herramienta que fortalezca un informe emitido por parte del médico reumatólogo para medir la actividad de la enfermedad o tal vez predecir el pronóstico de la enfermedad en los pacientes. El desarrollar estas moléculas es importante, ya que sirven para un progreso biotecnológico innovador que quizás en un futuro lleve a que alguno de estos péptidos ayude eficientemente en la generación de un anticuerpo monoclonal y funcione para probarlo en un modelo *in vivo* para monitorizar su eficacia, y su seguridad.

15. BIBLIOGRAFIA

1. Birch JT, Bhattacharya S. Emerging trends in diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis. *Prim Care*. diciembre de 2010;37(4):779-92, vii.
2. Mota LMH da, Cruz BA, Brenola CV, Brenol CV, Pereira IA, Rezende-Fronza LS, et al. Guidelines for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol*. abril de 2013;53(2):141-57.
3. Grassi W, De Angelis R, Lamanna G, Cervini C. The clinical features of rheumatoid arthritis. *Eur J Radiol*. mayo de 1998;27 Suppl 1:S18-24.
4. Kay J, Upchurch KS. ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatol Oxf Engl*. diciembre de 2012;51 Suppl 6:vi5-9.
5. Wasserman AM. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *Am Fam Physician*. 1 de diciembre de 2011;84(11):1245-52.
6. Turesson C, O'Fallon WM, Crowson CS, Gabriel SE, Matteson EL. Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years. *Ann Rheum Dis*. agosto de 2003;62(8):722-7.
7. Carmona L, Villaverde V, Hernández-García C, Ballina J, Gabriel R, Laffon A, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain. *Rheumatol Oxf Engl*. enero de 2002;41(1):88-95.
8. Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum*. diciembre de 2006;36(3):182-8.
9. Peláez-Ballestas I, Sanin LH, Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Burgos-Vargas R, Garza-Elizondo M, et al. Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *J Rheumatol Suppl*. enero de 2011;86:3-8.
10. Chopra A. The COPCORD world of musculoskeletal pain and arthritis. *Rheumatol Oxf Engl*. noviembre de 2013;52(11):1925-8.
11. Alpizar-Rodriguez D, Brulhart L, Mueller RB, Möller B, Dudler J, Ciurea A, et al. The prevalence of anticitrullinated protein antibodies increases with age in healthy individuals at risk for rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. marzo de 2017;36(3):677-82.
12. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet Lond Engl*. 22 de octubre de 2016;388(10055):2023-38.
13. Kasper D, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson J, Loscalzo J. HARRISON MANUAL DE MEDICINA. 19.^a ed. Mc Graw Hill Education; 2017. 845-847 p.
14. Rueda B, Orozco G, Sánchez E, Oliver J, Martín J. [Common genetic factors in autoimmunity]. *Reumatol Clin*. marzo de 2008;4 Suppl 1:1-4.

15. Viatte S, Plant D, Raychaudhuri S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* marzo de 2013;9(3):141-53.
16. Abbul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai. *INMUNOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR.* 9a ed. España: ELSEVIER; 2018. 564 p.
17. M. Roitt I, J. Delves Peter. *Essential Immunology.* Tenth Edition. Blackwell Science; 2001. 461 p.
18. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* noviembre de 1987;30(11):1205-13.
19. van Gaalen FA, van Aken J, Huizinga TWJ, Schreuder GMT, Breedveld FC, Zanelli E, et al. Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* julio de 2004;50(7):2113-21.
20. Liu WX, Jiang Y, Hu QX, You XB. HLA-DRB1 shared epitope allele polymorphisms and rheumatoid arthritis: a systemic review and meta-analysis. *Clin Investig Med Med Clin Exp.* 1 de diciembre de 2016;39(6):E182-203.
21. Zanelli E, Breedveld FC, de Vries RR. HLA association with autoimmune disease: a failure to protect? *Rheumatol Oxf Engl.* octubre de 2000;39(10):1060-6.
22. Malmström V, Catrina AI, Klareskog L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nat Rev Immunol.* enero de 2017;17(1):60-75.
23. Ruiz-Esquide V, Sanmartí R. Tobacco and other environmental risk factors in rheumatoid arthritis. *Reumatol Clin.* diciembre de 2012;8(6):342-50.
24. Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, Venables PJ. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol.* diciembre de 2010;6(12):727-30.
25. Kolfenbach JR, Deane KD, Derber LA, O'Donnell CI, Gilliland WR, Edison JD, et al. Autoimmunity to peptidyl arginine deiminase type 4 precedes clinical onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* septiembre de 2010;62(9):2633-9.
26. Mondal S, Thompson PR. Protein Arginine Deiminases (PADs): Biochemistry and Chemical Biology of Protein Citrullination. *Acc Chem Res.* 19 de marzo de 2019;52(3):818-32.
27. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol.* 26 de enero de 2009;184(2):205-13.
28. Corsiero E, Pratesi F, Prediletto E, Bombardieri M, Migliorini P. NETosis as Source of Autoantigens in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol [Internet].* 2016 [citado 7 de mayo de 2023];7. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2016.00485>

29. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* [Internet]. 15 de enero de 2007 [citado 16 de mayo de 2022];176(2):231-41. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2063942/>
30. Darrah E, Rosen A, Giles JT, Andrade F. Peptidylarginine deiminase 2, 3 and 4 have distinct specificities against cellular substrates: novel insights into autoantigen selection in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. enero de 2012;71(1):92-8.
31. de Brito Rocha S, Baldo DC, Andrade LEC. Clinical and pathophysiologic relevance of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Adv Rheumatol* [Internet]. 17 de enero de 2019 [citado 4 de agosto de 2021];59(1):2. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s42358-018-0042-8>
32. Kocbach A, Herseth JI, Låg M, Refsnes M, Schwarze PE. Particles from wood smoke and traffic induce differential pro-inflammatory response patterns in co-cultures. *Toxicol Appl Pharmacol*. 15 de octubre de 2008;232(2):317-26.
33. Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K, Tsuji G, Nakazawa T, Morinobu A, et al. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis*. enero de 2010;69(1):70-81.
34. Gerlag DM, Raza K, van Baarsen LGM, Brouwer E, Buckley CD, Burmester GR, et al. EULAR recommendations for terminology and research in individuals at risk of rheumatoid arthritis: report from the Study Group for Risk Factors for Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2 de marzo de 2012 [citado 27 de agosto de 2023];71(5):638-41. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3329228/>
35. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis 2018. *Nat Rev Dis Primer*. 8 de febrero de 2018;4:18001.
36. Ding Q, Hu W, Wang R, Yang Q, Zhu M, Li M, et al. Signaling pathways in rheumatoid arthritis: implications for targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 17 de febrero de 2023 [citado 5 de mayo de 2023];8(1):1-24. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41392-023-01331-9>
37. Malmström V, Catrina AI, Klareskog L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nat Rev Immunol*. enero de 2017;17(1):60-75.
38. Sánchez-Ramón S, López-Longo FJ, Carreño L. [Interleukins network in rheumatoid arthritis pathophysiology: beyond proinflammatory cytokines]. *Reumatol Clin*. marzo de 2011;6S3:S20-24.
39. Feldmann M, Maini SRN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. *Immunol Rev*. junio de 2008;223:7-19.
40. Pandolfi F, Franza L, Carusi V, Altamura S, Andriollo G, Nucera E. Interleukin-6 in Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci*. 23 de julio de 2020;21(15).

41. Drexler SK, Kong PL, Wales J, Foxwell BM. Cell signalling in macrophages, the principal innate immune effector cells of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(5):216.
42. Croft AP, Campos J, Jansen K, Turner JD, Marshall J, Attar M, et al. Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage in arthritis. *Nature.* junio de 2019;570(7760):246-51.
43. Segura E, Touzot M, Bohineust A, Cappuccio A, Chiocchia G, Hosmalin A, et al. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity.* 21 de febrero de 2013;38(2):336-48.
44. Fang Q, Zhou C, Nandakumar KS. Molecular and Cellular Pathways Contributing to Joint Damage in Rheumatoid Arthritis. *Mediators Inflamm.* 2020;2020:3830212.
45. Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest.* mayo de 2012;122(5):1791-802.
46. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol.* enero de 2008;8(1):34-47.
47. Rosales C, Uribe-Querol E. Fc receptors: Cell activators of antibody functions. *Adv Biosci Biotechnol.* 1 de abril de 2013;4:21-33.
48. Wang R, Wang G. Protein Modification and Autophagy Activation. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1206:237-59.
49. Damgaard D, Bjørn ME, Steffensen MA, Pruijn GJM, Nielsen CH. Reduced glutathione as a physiological co-activator in the activation of peptidylarginine deiminase. *Arthritis Res Ther.* 5 de mayo de 2016;18(1):102.
50. Fujisaki M, Sugawara K. Properties of peptidylarginine deiminase from the epidermis of newborn rats. *J Biochem (Tokyo).* enero de 1981;89(1):257-63.
51. Jones JE, Causey CP, Knuckley B, Slack-Noyes JL, Thompson PR. Protein arginine deiminase 4 (PAD4): Current understanding and future therapeutic potential. *Curr Opin Drug Discov Devel.* septiembre de 2009;12(5):616-27.
52. Tarcsa E, Marekov LN, Mei G, Melino G, Lee SC, Steinert PM. Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J Biol Chem.* 29 de noviembre de 1996;271(48):30709-16.
53. Lundström E, Källberg H, Alfredsson L, Klareskog L, Padyukov L. Gene-environment interaction between the DRB1 shared epitope and smoking in the risk of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis: all alleles are important. *Arthritis Rheum.* junio de 2009;60(6):1597-603.
54. Raychaudhuri S, Sandor C, Stahl EA, Freudenberg J, Lee HS, Jia X, et al. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 29 de enero de 2012;44(3):291-6.

55. Nakken B, Papp G, Bosnes V, Zeher M, Nagy G, Szodoray P. Biomarkers for rheumatoid arthritis: From molecular processes to diagnostic applications-current concepts and future perspectives. *Immunol Lett* [Internet]. 1 de septiembre de 2017 [citado 4 de agosto de 2021];189:13-8. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247817302079>
56. Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*. 1 de enero de 1998;101(1):273-81.
57. Damgaard D, Bawadekar M, Senolt L, Stensballe A, Shelef MA, Nielsen CH. Relative efficiencies of peptidylarginine deiminase 2 and 4 in generating target sites for anti-citrullinated protein antibodies in fibrinogen, alpha-enolase and histone H3. *PloS One*. 2018;13(8):e0203214.
58. Christophorou MA, Castelo-Branco G, Halley-Stott RP, Oliveira CS, Loos R, Radziszewska A, et al. Citrullination regulates pluripotency and histone H1 binding to chromatin. *Nature*. 6 de marzo de 2014;507(7490):104-8.
59. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*. 26 de enero de 2009;184(2):205-13.
60. Yu HC, Lu MC. The roles of anti-citrullinated protein antibodies in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ci Ji Yi Xue Za Zhi Tzu-Chi Med J*. marzo de 2019;31(1):5-10.
61. Darrah E, Andrade F. Rheumatoid arthritis and citrullination. *Curr Opin Rheumatol*. enero de 2018;30(1):72-8.
62. Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, et al. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation. *Science*. 8 de octubre de 2004;306(5694):279-83.
63. Tilvawala R, Nguyen SH, Maurais AJ, Nemmara VV, Nagar M, Salinger AJ, et al. The Rheumatoid Arthritis-Associated Citrullinome. *Cell Chem Biol*. 21 de junio de 2018;25(6):691-704.e6.
64. Khatri S, Hansen J, Astakhova K. Antibodies to synthetic citrullinated peptide epitope correlate with disease activity and flares in rheumatoid arthritis. *PloS One*. 2020;15(4):e0232010.
65. Burska AN, Hunt L, Boissinot M, Strollo R, Ryan BJ, Vital E, et al. Autoantibodies to posttranslational modifications in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:492873.
66. Carubbi F, Alunno A, Gerli R, Giacomelli R. Post-Translational Modifications of Proteins: Novel Insights in the Autoimmune Response in Rheumatoid Arthritis. *Cells*. 29 de junio de 2019;8(7).

67. Brekke OH, Sandlie I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat Rev Drug Discov.* enero de 2003;2(1):52-62.
68. Volkov M, van Schie KA, van der Woude D. Autoantibodies and B Cells: The ABC of rheumatoid arthritis pathophysiology. *Immunol Rev.* marzo de 2020;294(1):148-63.
69. Pope JE, Movahedi M, Rampakakis E, Cesta A, Sampalis JS, Keystone E, et al. ACPA and RF as predictors of sustained clinical remission in patients with rheumatoid arthritis: data from the Ontario Best practices Research Initiative (OBRI). *RMD Open.* 2018;4(2):e000738.
70. Brink M, Hansson M, Mathsson L, Jakobsson PJ, Holmdahl R, Hallmans G, et al. Multiplex analyses of antibodies against citrullinated peptides in individuals prior to development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* abril de 2013;65(4):899-910.
71. Alunno A, Bistoni O, Pratesi F, La Paglia GMC, Puxeddu I, Migliorini P, et al. Anti-citrullinated alpha enolase antibodies, interstitial lung disease and bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl.* 1 de mayo de 2018;57(5):850-5.
72. Snir O, Widhe M, Hermansson M, von Spee C, Lindberg J, Hensen S, et al. Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum.* enero de 2010;62(1):44-52.
73. Bizzaro N, Mazzanti G, Tonutti E, Villalta D, Tozzoli R. Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. *Clin Chem.* junio de 2001;47(6):1089-93.
74. Vos I, Van Mol C, Trouw LA, Mahler M, Bakker JA, Van Offel J, et al. Anti-citrullinated protein antibodies in the diagnosis of rheumatoid arthritis (RA): diagnostic performance of automated anti-CCP-2 and anti-CCP-3 antibodies assays. *Clin Rheumatol.* julio de 2017;36(7):1487-92.
75. Debaugnies F, Servais G, Badot V, Noubouossie D, Willems D, Corazza F. Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies: a comparison of different assays for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol.* 2013;42(2):108-14.
76. Maksymowych WP, van der Heijde D, Allaart CF, Landewé R, Boire G, Tak PP, et al. 14-3-3 η is a novel mediator associated with the pathogenesis of rheumatoid arthritis and joint damage. *Arthritis Res Ther.* 21 de abril de 2014;16(2):R99.
77. Ea HK, Bazille C, Lioté F. Histología y fisiología de la membrana sinovial. *EMC - Apar Locomot [Internet].* 1 de enero de 2008 [citado 9 de diciembre de 2021];41(4):1-6. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286935X08709122>
78. Elsevier, Connect E. Elsevier Connect. [citado 10 de diciembre de 2021]. Colágenos: tipos, composición, características y distribución en tejidos. Disponible en: <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/colagenos-tipos-composicion-distribucion-tejidos>
79. Masson-Bessière C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, 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 Baltim Md* 1950. 15 de marzo de 2001;166(6):4177-84.

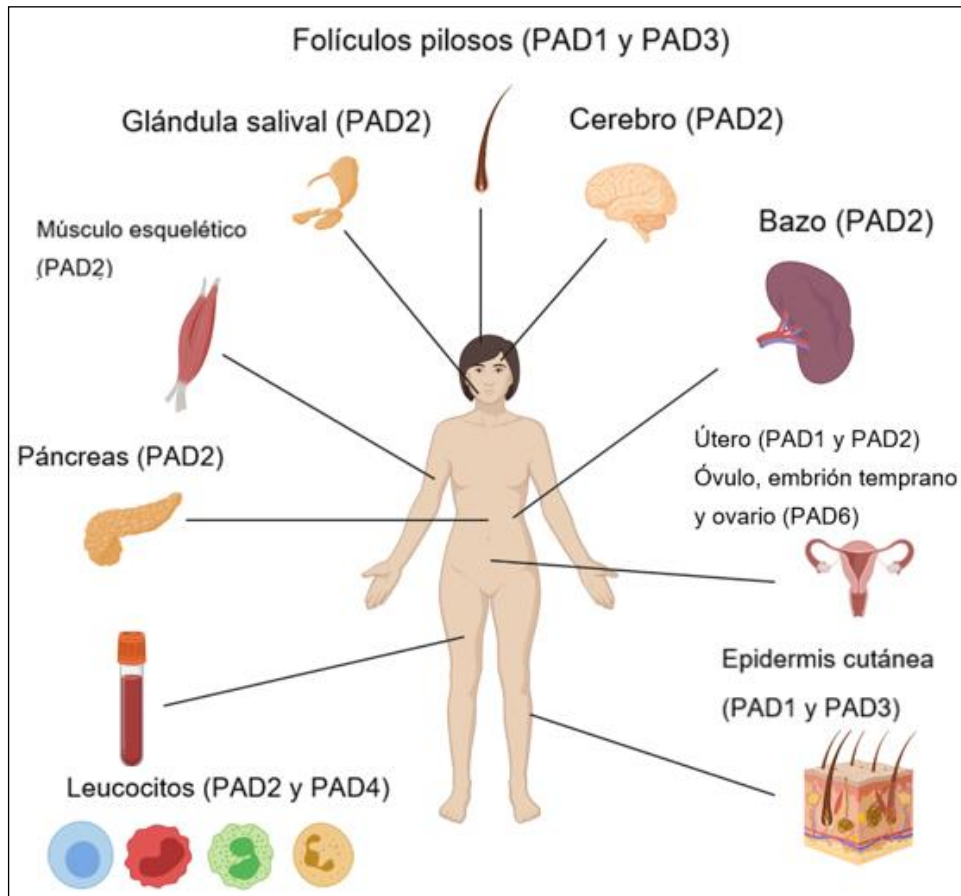
80. Girbal-Neuhauser E, Durieux JJ, Arnaud M, Dalbon P, Sebbag M, Vincent C, et al. The Epitopes Targeted by the Rheumatoid Arthritis-Associated Antifilaggrin Autoantibodies are Posttranslationally Generated on Various Sites of (Pro)Filaggrin by Deimination of Arginine Residues. *J Immunol [Internet]*. 1 de enero de 1999 [citado 1 de junio de 2021];162(1):585-94. Disponible en: <https://www.jimmunol.org/content/162/1/585>
81. Carubbi F, Alunno A, Gerli R, Giacomelli R. Post-Translational Modifications of Proteins: Novel Insights in the Autoimmune Response in Rheumatoid Arthritis. *Cells*. 29 de junio de 2019;8(7).
82. Sokolove J, Zhao X, Chandra PE, Robinson WH. Immune complexes containing citrullinated fibrinogen costimulate macrophages via Toll-like receptor 4 and Fcγ receptor. *Arthritis Rheum*. enero de 2011;63(1):53-62.
83. Mathsson L, Mullazehi M, Wick MC, Sjöberg O, van Vollenhoven R, Klareskog 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*. enero de 2008;58(1):36-45.
84. Burkhardt H, Sehnert B, Bockermann R, Engström A, Kalden JR, Holmdahl R. Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. mayo de 2005;35(5):1643-52.
85. Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*. 14 de febrero de 1980;283(5748):666-8.
86. Whittingham SF, Stockman A, Rowley MJ. Collagen Autoantibodies and Their Relationship to CCP Antibodies and Rheumatoid Factor in the Progression of Early Rheumatoid Arthritis. *Antibodies Basel Switz*. 5 de abril de 2017;6(2):E6.
87. Hawiger J, Timmons S, Kloczewiak M, Strong DD, Doolittle RF. gamma and alpha chains of human fibrinogen possess sites reactive with human platelet receptors. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 1 de marzo de 1982 [citado 12 de diciembre de 2021];79(6):2068-71. Disponible en: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.79.6.2068>
88. Hill JA, Bell DA, Brintnell W, Yue D, Wehrli B, Jevnikar AM, et al. Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. *J Exp Med*. 14 de abril de 2008;205(4):967-79.
89. Khatri S, Hansen J, Astakhova K. Antibodies to synthetic citrullinated peptide epitope correlate with disease activity and flares in rheumatoid arthritis. *PloS One*. 2020;15(4):e0232010.

90. Law SC, Street S, Yu CHA, Capini C, Ramnoruth S, Nel HJ, et al. T-cell autoreactivity to citrullinated autoantigenic peptides in rheumatoid arthritis patients carrying HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Arthritis Res Ther.* 17 de mayo de 2012;14(3):R118.
91. Joshua V, Schobers L, Titcombe PJ, Israelsson L, Rönnelid J, Hansson M, et al. Antibody responses to de novo identified citrullinated fibrinogen peptides in rheumatoid arthritis and visualization of the corresponding B cells. *Arthritis Res Ther.* 1 de diciembre de 2016;18(1):284.
92. Ioan-Facsinay A, Willemze A, Robinson DB, Peschken CA, Markland J, van der Woude D, et al. Marked differences in fine specificity and isotype usage of the anti-citrullinated protein antibody in health and disease. *Arthritis Rheum.* octubre de 2008;58(10):3000-8.
93. Boman A, Brink M, Lundquist A, Hansson M, Mathsson-Alm L, Rönnelid J, et al. Antibodies against citrullinated peptides are associated with clinical and radiological outcomes in patients with early rheumatoid arthritis: a prospective longitudinal inception cohort study. *RMD Open.* 2019;5(2):e000946.
94. Glumoff V, Savontaus M, Vehanen J, Vuorio E. Analysis of aggrecan and tenascin gene expression in mouse skeletal tissues by northern and in situ hybridization using species specific cDNA probes. *Biochim Biophys Acta.* 22 de noviembre de 1994;1219(3):613-22.
95. Buzás EI, Végvári A, Murad YM, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT. T-cell recognition of differentially tolerated epitopes of cartilage proteoglycan aggrecan in arthritis. *Cell Immunol.* junio de 2005;235(2):98-108.
96. von Delwig A, Locke J, Robinson JH, Ng WF. Response of Th17 cells to a citrullinated arthritogenic aggrecan peptide in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* enero de 2010;62(1):143-9.
97. Becart S, Whittington KB, Prislovsky A, Rao NL, Rosloniec EF. The role of posttranslational modifications in generating neo-epitopes that bind to rheumatoid arthritis-associated HLA-DR alleles and promote autoimmune T cell responses. *PLoS One.* 2021;16(1):e0245541.
98. Anticuerpos: un manual de laboratorio [Internet]. [citado 15 de mayo de 2023]. Disponible en: <http://antibodiesmanual.org/>
99. Yokoyama WM, Christensen M, Santos GD, Miller D, Ho J, Wu T, et al. Production of monoclonal antibodies. *Curr Protoc Immunol.* 1 de octubre de 2013;102:2.5.1-2.5.29.
100. CHI3L1 - Chitinase-3-like protein 1 - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [citado 10 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P36222/entry#structure>
101. Houston DR, Recklies AD, Krupa JC, van Aalten DMF. Structure and ligand-induced conformational change of the 39-kDa glycoprotein from human articular chondrocytes. *J Biol Chem.* 8 de agosto de 2003;278(32):30206-12.

102. Cinton C, Johansen JS, Christensen IJ, Price PA, Sørensen S, Nielsen HJ. High serum YKL-40 level after surgery for colorectal carcinoma is related to short survival. *Cancer*. 15 de julio de 2002;95(2):267-74.
103. Tanwar MK, Gilbert MR, Holland EC. Gene expression microarray analysis reveals YKL-40 to be a potential serum marker for malignant character in human glioma. *Cancer Res*. 1 de agosto de 2002;62(15):4364-8.
104. Lee CG, Hartl D, Lee GR, Koller B, Matsuura H, Da Silva CA, et al. Role of breast regression protein 39 (BRP-39)/chitinase 3-like-1 in Th2 and IL-13–induced tissue responses and apoptosis. *J Exp Med* [Internet]. 4 de mayo de 2009 [citado 12 de diciembre de 2021];206(5):1149-66. Disponible en: <https://doi.org/10.1084/jem.20081271>
105. Verheijden GF, Rijnders AW, Bos E, Coenen-de Roo CJ, van Staveren CJ, Miltenburg AM, et al. Human cartilage glycoprotein-39 as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. junio de 1997;40(6):1115-25.
106. Baeten D, Steenbakkers PGA, Rijnders AMW, Boots AM, Veys EM, De Keyser F. Detection of major histocompatibility complex/human cartilage gp-39 complexes in rheumatoid arthritis synovitis as a specific and independent histologic marker. *Arthritis Rheum*. febrero de 2004;50(2):444-51.
107. Yang ML, Sodré FMC, Mamula MJ, Overbergh L. Citrullination and PAD Enzyme Biology in Type 1 Diabetes - Regulators of Inflammation, Autoimmunity, and Pathology. *Front Immunol*. 2021;12:678953.

16. ANEXOS

ANEXO1. Ilustración de la expresión de proteínas específicas de órganos de las isoenzimas de peptidilarginina deiminasa (PAD) en humanos. Tomado de (107).



ANEXO 2. Secuencia total de aminoácidos de la proteína HC-gp39. Tomado de Uniprot. ID: P36222; <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P36222/entry>

Length 383	Last updated 2005-12-20 v2								
Mass (Da) 42,625	Checksumⁱ 6C9EF133BDC7C2D1								
MGVKASQTGF	VVLVLLQCCS	AYKLVCCYYTS	WSQYREGDGS	CFPDALDRFL	CTHIIYSFAN	ISNDHIDTWE	WNDVTLYGML	NTLKNRNPNL	
KTLLSVGGWN	FGSQRFKIA	SNTQSRRTFI	KSVPPFLRTH	GFDGLDLAWL	YPGRRDKQHF	TTLIKEMKAE	FIKEAQPQKK	QLLLSAALSA	
GKVTIDSSYD	IAKISQHLDF	ISIMTYDFHG	AWRGTGHHHS	PLFRGQEDAS	PDRFSNTDYA	VGYMLRLGAP	ASKLVMGIPT	<u>FGRSFTLASS</u>	
<u>ETGVGAPISG</u>	PGIPGRFTKE	AGTLAYYEIC	DFLRGATVHR	ILGQQVPYAT	KGNQWVGYYD	QESVKSQVQY	LKDRQLAGAM	VWALDLDLDFQ	
GSFCGQDLRF	PLTNAIKDAL	AAT							



La secuencia que se mandó a sintetizar con Genscript, fue desde el aminoácido 258-272, pero en la literatura toma en cuenta la secuencia como HC-gp 39 (263-275), debido a que con esa secuencia desarrollaron un AcM⁽¹⁰⁶⁾.

ANEXO 3. Características bioquímicas de las proteínas y de las secuencias a sintetizar.

PROTEINAS	aa	PM SECUENCIA CIT	PUNTO ISOELECTRICO PROTEINA	PUNTO ISOELECTRICO proteina CIT	No. De Asp (D)	No. De Glu (E)	No. (R)	No. R cit	No. lys (K)	No. His (H)	EUROINMUN aCCP
Fibrinógeno α P02671	20 aa	2097.32 Da	5.7	7.7	1	1	3	2		1	
Fibrinógeno α P02671	13 aa	1578.76 Da	5.7	6.7	1		1	1	1		
Fibrinógeno β P02675	17 aa	1989.19 Da	8.54	9.54	1	2	2	1	2	1	*
Colágeno tipo II P02458	13 aa	1283.32	6.58	8.58	1		2	2			*
Aggrecan P16112	20 aa	2219.55 Da	4.06	6.09	1	1	2	2	1		
Glicoproteína 39 del cartilago humano P36222	14 aa	42000.63 Da	8.69	9.7		1	1	1			

PROTEINAS	PESO MOLECULAR (Da)	PEPTIDO	SECUENCIA CONTROL	PM SECUENCIA CONTROL	NEUTRO	POLAR	NO POLAR	SECUENCIA CON CITRULINA
Fibrinógeno α P02671	94,973	Fibrinógeno α (31-50)	GGGVRGPRVVERHQSACKDS	2095.32 Da	X	X		GGGVcitGPRVVEcitHQSACKDS
Fibrinógeno α P02671	94,973	Fibrinógeno α (79-91)	QDFTNRINKLKNS	1577.76 Da	X	X		QDFTNcitINKLKNS
Fibrinógeno β P02675	55,928	Fibrinógeno β (36-52)	NEEGFFSARGHRPLDKK	1988.19 Da		X		NEEGFFSAcitGHRPLDKK
Colágeno tipo II P02458	141,785	Colágeno tipo II (660-673)	GARGLTGRPGDAGP	1281.39 Da			X	GAcitGLTGcitPGDAGP
Aggrecan P16112	261,329	Aggrecan (84-103)	VLLVATEGRVVRVNSAYQDK	2217.55 Da			X	VLLVATEGcitVcitVNSAYQDK
Glicoproteína 39 del cartilago humano P36222	42,625	(HCgp39)(263-275)	PTFGRSFTLASSET	1500.63 Da		X		PTFGcitSFTLASSET

ANEXO 4. Características en común de secuencias revisadas en publicaciones originales.

PROTEINA	in vitro 	in vivo 	Inmunorreactividad (D. O.)	Secuencia Swiss Prot	Plasma	Líquido sinovial	Histología	Prolif. células linfocito T	Secreción de citocinas (IL1, IL6, IL17, TNF α , IFN γ)	Asociación a Haplotipos HLA/EC (DR1, DR4)	Estudios clínicos
Glicoproteína 39 del cartilago humano "Hcg39" (263-275)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Agregano (84-103)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Colágeno tipo II (360-373)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Fibrinógeno α (31-50)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Fibrinógeno α (79-91)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Fibrinógeno β (36-52)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

D. O: (Densidad Óptica)

Características en común





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Alma Eloísa Varela Ramírez

Título de la tesis: Evaluación de la inmunorreactividad del péptido citrulinado PTFGcitSFTLASSET en una cohorte de pacientes con artritis reumatoide y desarrollo preliminar de suero hiperinmune

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Deshiré Alpizar Rodríguez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma UAEM

24/Octubre/2023

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México. C.P. 62209, Edificio 61, ala C, 2° piso.
Tel. (777) 329 7000, Ext. 7986 Jefatura de Posgrado en Farmacia posgrado_ff@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

Firma Jurado

Fecha



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DESHIRÉ ALPÍZAR RODRÍGUEZ | Fecha:2023-11-02 15:04:42 | Firmante

i05Vt+C27Wz6ZGqaseVzkJY/0H63ICjR17mmtUUe7HZuAh5nJe+AajU6IHvIQpkbAFEKkuiVQhut7Li2XAzC77nLW2/02Nbu1RZYxzvVGAi8rM+tLaMkw5pfV8zjToGAHtHzEzuQqC
x+oSvBpOpvpsCqM3bZgvLdcxMnJj1td2OockyEePN4a04yoP/e2wX0VTeMf+OX8evCBIY1R+CSEabJqRB7Wi0ekDnqB1Q/HpmotSFRvDQnFa5yuRJ6DSKXf1YLFV71wvJLvyZe
vT65HDLCEbRHFRIpnsEhuOQheyWi11KLGaizilqrGXIGHoqXXnXB+AXY73Lc6l66HlrGQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



3sMT2RIGX

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/5AL3a6fzcmu2yYKW5vceWqlwgV3oHZ4>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Alma Eloísa Varela Ramírez

Título de la tesis: Evaluación de la inmunorreactividad del péptido citrulinado PTFGcitSFTLASSET en una cohorte de pacientes con artritis reumatoide y desarrollo preliminar de suero hiperinmune

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Judith González Christen

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma UAEM

24/Octubre/2023

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México. C.P. 62209, Edificio 61, ala C, 2° piso.
Tel. (777) 329 7000, Ext. 7986 Jefatura de Posgrado en Farmacia posgrado_ff@uaem.mx





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Firma Jurado

Fecha

FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUDITH GONZALEZ CHRISTEN | Fecha:2023-11-01 13:49:33 | Firmante

oMNBURPeHEaDImwHn9fh33jW5xbWx0uD7NKKtIEZxM/unqv7AI1ydU0BGgs/Abp3PvWJgt8I8vUHX/6LOA7FeMjpFi7Z2kOPAvGZ+SFaFr3Hyb3ejzTurXtd/0JjRsa7WduUGkv
CHyW0OM6FrMsrqatLDoJw3Q/SLIuwrcutPeilK1vNNv3uqOmi99fu4oOyV0kG529smKaJM6IUbo3p1xGf7dkLfMDstf90P1LR9iauiM4afGQrFgZ574+DluXjqhGyeX5dsIggvkb+nxG
zhYxWs5SzkE2inOmi1qUBJTi5LWT4gwTRBpL4e/LBLdcJ8FL63LEeBp5MQtZeju9g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[xeOj8IVdf](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/8xZEIT3A2xXTA8OamiSMYO1fp4VQHlcW>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado



**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Alma Eloísa Varela Ramírez

Título de la tesis: Evaluación de la inmunorreactividad del péptido citrulinado PTFGcitSFTLASSET en una cohorte de pacientes con artritis reumatoide y desarrollo preliminar de suero hiperinmune

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Diana L. Gómez Galicia

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma UAEM

24/Octubre/2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Firma Jurado

Fecha

FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DIANA LIZBETH GOMEZ GALICIA | Fecha:2023-11-01 12:06:08 | Firmante

ieoFj5dSa15Nki7kpoXmhBcl9AC1B68fUHQ8HzAFvxclmIMYavEj0TMzrWYgUzJ5KDQeDn5NKR1ZTnosN3zMhXsan7iyG2fXji0VInEVZgAkQzXjT3RwbyTxU4100ppHyy68uq3fpjUxDI16YQbJBbROv8Cqd/vQHp2017RXXHZcYv2BHRNNYEf50L6aDOoQNEcaA1kewbXg5HI2V0Rmr6PbjJTLEfNDIWWuGHu0ajwWemBsncoGHItaTptfQvyALmJoCUnDstjWK36YnWLEh3KEm3cmO+5+Q7W/YRcc1XMVxwIWO9FL4Qo2WRaZekh/O3h2L0xbiewAHIQwGBLg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[zoab2kFiE](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/z07GbvIkt2el2u2rlZyVICHplSn9Y0PJ>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Alma Eloísa Varela Ramírez

Título de la tesis: Evaluación de la inmunorreactividad del péptido citrulinado PTFGcitSFTLASSET en una cohorte de pacientes con artritis reumatoide y desarrollo preliminar de suero hiperinmune

Grado a obtener:

X Maestría en Farmacia

Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Fernando R. Esquivel Guadarrama

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

X Si se aprueba tal como se presenta

Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

e-firma UAEM

24/Octubre/2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Firma Jurado

Fecha

FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FERNANDO ROGER ESQUIVEL GUADARRAMA | Fecha:2023-11-01 12:12:06 | Firmante

WxJYdq+r027+D/bWD/Ru0frYn7gU8QHvA6EY/++8MUFve49GaT1jppoDSkCmsGMSKxgvgYrMtwAphyGBrbKHmtdTu9/LEe4V1YS5Nb6MgKT2EI816/hFDK9QIWDz++nOm3dx3YrmaPFB09EIsksuB2PPjZC52/eT2LzxD/XclIWdnddJAV3OvQHFk31jSmsXFvZqJXHwAP6Px9bQNPOyviA9ODzTH23Fnr+yJoUBM5Vi/fuwmlElxgJf11+xr9svEWuiB8LnxDqoxQ9mTovUwFQJrY5eoObyg14Zu7Dzu35SVBIOHbVR/WIDX/TcnS4zzA0ceFRIOBfpC8zxsV TNA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



14CGHDg20

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Eg86z1e8eOPIADtUi8Se9XAyVK2m9TCQ>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Firma Jurado

Fecha

FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE LUIS MONTIEL HERNANDEZ | Fecha:2023-10-31 20:56:04 | Firmante

RibHsbsqSoYAPgfrX7y751WQceArh3eq6pE8aXoDDF8cXMxjWhtDmVCTogcYsx4ZBCvT8p+134Hget5CWcTweEaL9KX5DApmnyTzO1HLSF7Gzq7TFBbXEMbbAEzsFj912/64uFaRtcookLLBsCEj6qta6yHCxTaYJwnagVglo54Nvs8GPvUrE7Wvi3NDX9YV9ki0QC3Y3vEB1Tdwi4qFH5MGVsHI3AjnbITqoC1yW5feywHciG6xBThW02OnLIHKFePdqbZ72zXF B1YSy1+S/xaeNDP37msYLVnAtt4NF+YPH4WDGNu6iQc66iSvj5Zmw590n1/BANpSmXL8o0wGA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[CVMerKR2h](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/9R11yIEltNkDXgomZM0PStzFMqdDcw0i>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

Dirección / Secretaría de Investigación

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Morelos a 14 de junio de 2023
Folio: FF/M/SI/CIP/MF/062/2023

LF. ALMA ELOÍSA VARELA RAMÍREZ
ALUMNO DE MAESTRÍA EN FARMACIA
P R E S E N T E

Por este medio le informo que el Consejo Interno de Posgrado (CIP), en su Sesión Ordinaria del 14 de junio de 2023, designó a los siguientes sinodales como integrantes de la Comisión Revisora de tesis y jurado para la tesis titulada **“Evaluación de la inmunorreactividad del péptido citrulinado PTFGcitSFTLASSET en una cohorte de pacientes con artritis reumatoide y desarrollo preliminar de suero hiperinmune”**.

Sinodal

Presidente Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama
Secretario Dra. Diana Lizbeth Gómez Galicia^{NA}
Vocal 1 Dra. Deshiré Alpizar Rodríguez
Suplente 1 Dra. Judith González Christen^{NA}
Suplente 2 Dr. José Luis Montiel Hernández^{NA}

Adscripción

Facultad de Medicina-UAEM
Facultad de Farmacia-UAEM
Colegio Mexicano de Reumatología
Facultad de Farmacia-UAEM
Facultad de Farmacia-UAEM

NA = Núcleo Académico de Posgrado en Farmacia

Se le solicita entregar el manuscrito de tesis para revisión a esta comisión y dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos.

Nota (Art. 74 RGEPUAEM): Los sinodales tendrán un plazo máximo de 20 días hábiles contados a partir de la recepción del documento de tesis para entregar los comentarios de la revisión y para emitir un voto aprobatorio o negatorio. En caso de condicionar el voto a la entrega de un documento en el que el tesista deberá solventar lo revisado, este contará con un plazo no mayor a 20 días hábiles, contados a partir de la notificación del primer dictamen emitido, para integrar las correcciones señaladas, una vez fenecido dicho plazo el sinodal emitirá el voto aprobatorio o negatorio que corresponda.

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
“Por una humanidad culta
una Universidad de Excelencia”

e-firma UAEM

Dr. Sergio Alcalá Alcalá
Jefe de Posgrado
Facultad de Farmacia

ccp: archivo.

Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama; Dra. Diana Lizbeth Gómez Galicia; Dra. Deshiré Alpizar Rodríguez; Dra. Judith González Christen; Dr. José Luis Montiel Hernández



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

SERGIO ALCALA ALCALA | Fecha:2023-06-15 13:18:01 | Firmante

AUD38VpiGjJpj4akSzxPgCFWor5NR/L73epWBeiZ9jUu72fqTZiaMPVbsJOWjgIKfZ4r1IdB98h/J3CI79UxrODe9tg4rlsZXKgfDv2e03syWDFn7NOJyMCeZdNL0WQm18E90UnxX2kaYHZdlp7R3xclpcG6/q8N2PBdmJIB7GK9E3y8y/LP6pm8Wwc5BRHBmiCgm/KSey4ZpSQxf0QhIOTPFMZlgOCgOUleCQyzuCAP+u1zv/VDvpGe6vtw6ZlpT0nMoQjqGNBda8E7RBBc7W5W4uffNrhxnEanKRPYDjth5sxmBcgj2CeAZu11MmJuQUz/1wFOO4dfP5FkAaAuA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[qKu6wzey2](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/57GaE7gcBBgRryZx7kqZn0GmyyZRclkh>

