COMPARACIÓN ESTRUCTURAL ENTRE LOS PÉPTIDOS USADOS EN LA DETECCIÓN INMUNOENZIMÁTICA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE Y SUS CORRESPONDIENTES SECUENCIAS EN LAS PROTEÍNAS NATIVAS

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TITULO DE:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

KENDY VILLALOBOS OLIVEROS

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS

FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN

PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

2015

COMPARACIÓN ESTRUCTURAL ENTRE LOS PÉPTIDOS USADOS EN LA DETECCIÓN INMUNOENZIMÁTICA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE Y SUS CORRESPONDIENTES SECUENCIAS EN LAS PROTEÍNAS NATIVAS

KENDY VILLALOBOS OLIVEROS

DIRECTOR

JULIO CESAR CALVO MOZO, Ph.D.

UNIVERSIDAD FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS

FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN

PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

2015

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es el resultado del esfuerzo y la dedicación no solo mía como autora, sino también del trabajo de otras personas, quienes me brindaron su apoyo y contribuyeron en su realización.

En primer lugar, le agradezco a Dios y a la vida, por permitirme realizar este trabajo, el cual significa la concreción de una de mis metas a nivel personal.

Agradezco a mi madre por brindarme su apoyo incondicional, a mis amigas que me acompañaron durante el proceso.

Agradezco a mi asesor el Dr. Julio Calvo por su paciencia, por la asesoría y contribución permanente, sin la cual no hubiera podido llevar a cabo esta investigación.

Nota de aceptación

_____

_____

_____

_____

Presidente del Jurado

_____

Jurado

_____

Jurado

Ciudad y Fecha (día, mes, año) (Fecha de entrega)

CONTENIDO

	Pág.
1. Introducción	**9**
2. Planteamiento del problema	**10**
3. Justificación	**12**
4. Objetivos	**13**
4.1.Objetivo general	**13**
4.2. Objetivos específicos	**13**
5. Marco Teórico	**14**
5.1. Artritis Reumatoide	**14**
5.2. Etiología de la Artritis Reumatoide	**15**
5.3. Criterios de diagnóstico	**16**
5.4. Fisiopatología de la Artritis Reumatoide	**18**
5.5. Activación de las células T	**20**
5.6. Genética de la Artritis Reumatoide	**24**
5.7. Diagnóstico Clínico de la Artritis Reumatoide	**25**
5.8. Marcadores para el diagnóstico	**27**
5.9.Citrulinación en la artritis reumatoide	**29**
5.9.1. Proteínas Citrulinadas en la artritis reumatoide	**31**
6. Metodología	**33**
6.1. Secuencia de los péptidos usados en ELISA	**33**
6.2. Alineamiento de secuencias con Delta-Blast	**33**
6.3. Predicción de estructura de las proteínas	**33**
6.4. Análisis y comparación de secuencias en la proteína	**33**
7. Resultados y discusión	**34**
7.1. Identificación de secuencias usadas en ELISA	**34**
7.2. Alineamiento de secuencias con Blast	**34**
7.3. Predicción de estructura de las proteínas y análisis de la secuencia	**37**

8. Conclusiones **40**

9. Recomendaciones **41**

10. Bibliografía **42**

Anexo. Cálculo de la estructura de β-Fibrina **44**

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Esquema de una articulación normal y de una articulación con Artritis Reumatoide (tomado de OLIVER, 2006) **13**

Figura 2. Fisiopatología de la artritis reumatoide. Esquema fisiopatológico general de la artritis reumatoide. AC: anticuerpo; BAFF: factor activador de células B; Blys: estimulador de linfocitos B; CD: cúmulo de diferenciación; CPA: célula presentadora de antígeno; CPH: complejo principal de histocompatibilidad; CTLA4: antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico; C5a: fracción 5a del complemento; FR: factor reumatoide; Ig: inmunoglobulina; IL: interleucina; MMP: metaloproteasas de la matriz; RANK: receptor activador del factor nuclear _appa B; RANKL: ligando de receptor activador para el factor nuclear _appa B; RCT: receptor de linfocitos T; TNF: factor de necrosis tumoral. Tomado de (Herreo - Beaumont et al., 2012) **17**

Figura 3: Mecanismo de acción del abatacept. El fragmento del abatacept constituido por el dominio extracelular del CTLA4 se une a los receptores CD80/CD86, evitando o desplazando su interacción con el receptor CD28. De esta forma se bloquea selectivamente la unión específica de los receptores CD80/CD86 al CD28, lo que equivale, fisiopatológicamente, a bloquear la segunda señal de la activación inmunitaria y, por tanto, la activación de las células T. CPA: célula presentadora de antígeno; CPH: complejo principal de histocompatibilidad; RCT: receptor de células T. **22**

Figura 4: Cadena de señales de la Artritis Reumatoide. **24**

Figura 5. Alineamiento de la secuencia 1 con Delta-Blast **34**

Figura 6. Alineamiento de la secuencia 2 con Delta-Blast **35**

Figura 7. Alineamiento de la secuencia 3 con Delta-Blast **35**

Figura 8. Estructura 3-D de la proteína β-fibrina usando QUARK **36**

Figura 9. Estructura secundaria de la proteína β-fibrina. **37**

Figura 10. Predicción de accesibilidad a solventes de β-fibrina. **37**

Figura 11. Estructura 3-D de la proteína α-fibrina con I-TASSER. **37**

Figura 12. Estructura secundaria de la proteína α-fibrina. **38**

Figura 13. Predicción de accesibilidad a solventes de α-fibrina. **39**

RESÚMEN

La Artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por una inflamación y destrucción de las articulaciones. Aunque su causa es desconocida, se han identificado factores ambientales, endocrinosy genéticos relacionados con su desarrollo. Hasta hace poco la determinación del factor reumatoide, era la única prueba utilizada para el estudio de esta patología. Esta técnica no es muy sensible, ni específica, y es positiva para otras enfermedades. Estudios recientes han revelado que sueros depacientes con artritis, reconocen por ensayos de ELISA péptidos cíclicos sintéticos que contienen el aminoácido citrulina (X). Los anticuerpos anti-péptidos citrulinados cíclicos son muy específicos para la artritis reumatoide y están presentes en al menos 60-75% de los pacientes estudiados, con una especificidad de 95-100%.Esta alta especificidad combinada con su presencia temprana en la enfermedad, incluso antes de que la enfermedad sea manifiesta, sugiere un papel importante de estos anticuerpos en la patogénesis de la enfermedad. En este trabajo se analizó la secuencia de origen de los péptidos HSTKRGHAKSRPVXG y ARGHXPLDKKREEAPSLXPA con el programa DELTA-BLAST y luego se calculó la estructura tridimensional de las proteínas de origen. El análisis estructural de las secuencias de referencia muestra que es posible rediseñar estos péptidos para obtener mejores mimos estructurales. Se espera que estos péptidos rediseñados mejoren la afinidad y especificidad en los ensayos de ELISA y se pueda contribuir al diagnóstico precoz de la artritis reumatoide

1. INTRODUCCIÓN

La Artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune (producción de anticuerpos contra órganos y tejidos del paciente) que se caracteriza por una sinovitis inflamatoria y destrucción de las articulaciones. Su prevalencia es del 1 % de la población general y tres veces mayor en mujeres. Aunque su causa es desconocida, se han identificado factores ambientales, endocrinos y genéticos relacionados con su desarrollo (Guzmán, 2003).

Hasta hace poco la determinación del factor reumatoide, autoanticuerpos dirigidos contra la fracción constante de las inmunoglobulinas de clase IgG, era la única prueba utilizada para el estudio de esta patología, y su presencia era considerada como un criterio de clasificación de la enfermedad. No obstante, esta técnica no es muy sensible (66%), ni específica (87%), y es positiva para otras enfermedades autoinmunes, neoplàsicas y aún en personas sanas, especialmente en aquellas de edad avanzada.

Estudios recientes han revelado que sueros depacientes con artritis, reconocen por ensayos de ELISA péptidos sintéticos que contienen el aminoácido citrulina, un residuo modificado de arginina. Los anticuerpos anti-péptidos citrulinados cíclicos son muy específicos para la artritis reumatoide y están presentes en al menos 60-75% de los pacientes estudiados, con una especificidad de 95-100%. Esta alta especificidad combinada con su presencia temprana en la enfermedad, incluso antes de que la enfermedad sea manifiesta, sugiere un papel importante de estos anticuerpos en la patogénesis de la enfermedad.

En este trabajo se analizó la secuencia y estructura de los péptidos cíclicos que se han utilizado y se diseñaron nuevos péptidos que imitan mejor la estructura en las proteínas nativas. Se espera que al sintetizar estos péptidos mejore la afinidad y especificidad en los ensayos de diagnóstico.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La Artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por una sinovitis inflamatoria y destrucción de las articulaciones. La prevalencia de la AR es de aproximadamente 1% de la población general, con correspondencia tres veces mayor en la mujer. A pesar de que se han realizado muchos estudios acerca de esta enfermedad, aún se desconoce su causa. No obstante se han identificado factores endocrinos, ambientales y genéticos relacionados con el desarrollo de la misma.

Hasta hace poco la determinación del factor reumatoide (FR), un factor dirigido contra la fracción constante de las inmunoglobulinas de clase IgG, era la única prueba utilizada para el estudio de esta patología, y su presencia es considerada como un criterio de clasificación de la enfermedad. No obstante, el FR no es altamente sensible (66%), ni específico (87%), y puede encontrarse en otras enfermedades autoinmunes, neoplàsicas y aún en personas sanas, especialmente en aquellas de edad avanzada.

Debido a lo anterior se han estudiado otros anticuerpos asociados a la AR: Anticuerpos contra los péptidos cíclicos citrulinados (PCC) provenientes de secuencias de proteínas relacionadas, como marcadores útiles y precoces de la AR.

En la actualidad se han descubierto anticuerpos específicos para la AR, tales como:

- Anticuerpos contra la queratina (AKA)
- Anticuerpos contra el factor perinuclear (APF)
- Anticuerpos contra la Filagrina
- Anticuerpos contra los péptidos citrulinados (anti-PCC)

Los anti-PCC presentan una gran sensibilidad (80%) y especificidad (98%), en pacientes con AR, los cuales se presentan en etapas tempranas de la enfermedad.El antígeno reconocido por los anticuerpos APF y AKA, es el mismo y corresponde a la profilagrina (antiprofilagrina o antifilagrina). (Olivares et al 2009)

La Filagrina es una proteína epidérmica que se une a los filamentos intermedios de la queratina y promueve la formación de puentes disulfuro entre los filamentos intermedios durante las fases terminales de la diferenciación de las células epiteliales en mamíferos, que es sintetizada como un precursor proteico, la profilagrina.

Dada la limitada sensibilidad de los primeros ELISA que empleaban los péptidos lineales citrulinados, se desarrolló un péptido cíclico derivado de la Filagrina, que presentaba los residuos de la citrulina de forma óptima para ser reconocidos por los anticuerpos PCC; más sin embargo aún falta por alcanzar un mayor grado de sensibilidad, para que el diagnóstico de la AR sea eficaz, para que el paciente tenga un tratamiento temprano de esta patología y así evitar graves daños en las articulaciones y en otros órganos que pueden ser afectados (vista, pulmones, piel).

Dado que las proteínas no tienen una composición cíclica, sino una secuencia continua, suponemos que estos péptidos cíclicos están imitando subestructuras de la proteína (Filagrina), ya sea en forma de “loop” o de hélice, por lo cual queda pendiente explicar la causa de la no muy alta confianza en el diagnóstico de la AR.Y como respuesta a los PCC utilizados se genera la pregunta problema: ¿Será posible diseñar y sintetizar un fragmento de la Filagrina y la Fibrina, que genere anticuerpos que identifiquen la proteína con alta afinidad, para un mejor diagnóstico de la AR?

3. JUSTIFICACIÓN

La Artritis Reumatoide es una enfermedad sistémica y como tal no debería pensarse en los componentes de las articulaciones como antígenos responsables del padecimiento; sin embargo a lo largo de los estudios realizados se han sugerido una variedad de autoantígenos de estas como inductores de la respuesta autoinmune.

Clásicamente se han empleado los criterios establecidos por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) en 1987 para la clasificación de la Artritis Reumatoide (AR). No obstante, estos criterios están dirigidos más hacia la clasificación del estado del enfermo que hacia su diagnóstico temprano. La única prueba de laboratorio empleada en la actualidad que orienta hacia el diagnóstico de la Artritis Reumatoide es el factor reumatoide. Sin embargo, no se trata de una prueba definitiva para el diagnóstico dada su baja especificidad. (López 2005)

Desde los años 60 se han descrito diversos autoanticuerpos relacionados con la AR, unos más específicos que otros.

Debido a los problemas de especificidad y sensibilidad de estos autoanticuerpos y las dificultades técnicas para detectarlos han hecho que su estudio no se haya implantado en los laboratorios clínicos. Por todo esto se hace necesario un estudio exhaustivo de los marcadores específicos de la Artritis Reumatoide, analizando el papel que desempeñan en el desarrollo de la enfermedad, con el fin de crear un péptido que permita el reconocimiento del marcador o antígeno escogido, lo que nos llevaría a una forma de diagnóstico más precoz de la Artritis Reumatoide, lo cual permitiría que los pacientes tuvieran un tratamiento a tiempo, evitando complicaciones a futuro.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Comparar la estructura entre los péptidos usados en los ensayos de ELISA para detectar Artritis Reumatoide y sus correspondientes secuencias en las proteínas nativas de donde provienen.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una revisión bibliográfica sobre los antígenos relacionados con la Artritis Reumatoide.

- Identificar los péptidos usados en ensayos de ELISA para el diagnóstico de pacientes con Artritis Reumatoide.

- Analizar la estructura de los péptidos usados en los ensayos de ELISA en la proteína de donde provienen.

- Proponer un diseño mejorado de los péptidos, si no hay una buena concordancia estructural entre los péptidos usados en los ensayos de ELISA y dichas secuencias dentro de la proteína nativa.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica de origen autoinmunitario, caracterizada inicialmente por la inflamación de la membrana sinovial o sinovitis, que extiende hasta otras estructuras articulares como el hueso, el cartílago articular, ligamentos y tendones, causando a la larga su destrucción. Debido a su carácter sistémico, la inflamación crónica puede afectar a otros órganos, como el sistema nervioso periférico, el corazón, los pulmones, la piel o los ojos, provocando graves lesiones e incluso poniendo en riesgo la vida del paciente.(Tercero y Olalla 2010)

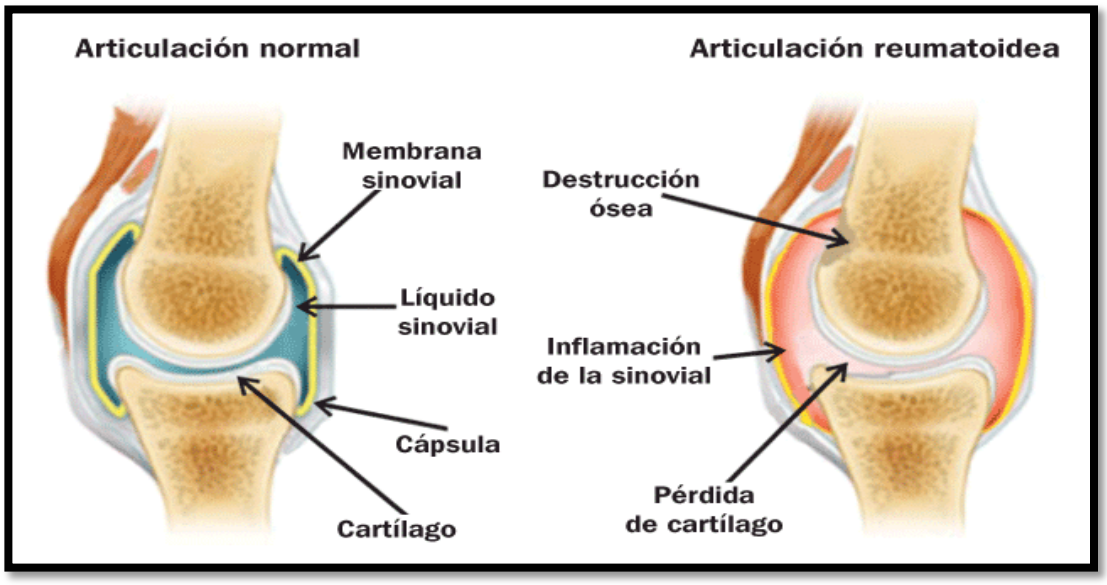


Figura1.Esquema de una articulación normal y de una articulación con Artritis Reumatoide (tomado de OLIVER, 2006)

5.2. ETIOLOGÍA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmunitaria que se desencadena por uno o varios factores desconocidos que inducen a la aparición de autoantígenos. La presentación de estos antígenos a los linfocitos T CD4 estimula la expresión de citocinas e induce y aumenta la proliferación de linfocitos B, con la consiguiente producción de anticuerpos. Los linfocitos B son los productores del factor reumatoide. Al comienzo de la enfermedad apenas un 60% de los pacientes son positivos para este marcador. No obstante, durante el primer año en algunos pacientes el factor reumatoide negativo se convierte en factor reumatoide positivo, de modo que este anticuerpo está presente en el 80% de los pacientes.

El factor reumatoide se considera como un factor de destrucción tisular y niveles altos de éste suelen asociarse a formas graves y activas de la enfermedad. Además de la proliferación de los linfocitos, el cartílago sufre un proceso inflamatorio que cursa con un aumento de las propias células sinoviales. La sinovitis se hace crónica, lo que puede provocar que la membrana sinovial aumente notablemente de tamaño (hasta cien veces su peso), debido a un comportamiento casi de tipo neoplásico. El tejido que se forma es el pannus, verdadero causante de la destrucción del cartílago, de los ligamentos y del hueso subcondral. En el pannus sinovial las citosinas proinflamatorias predominantes son la interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-alfa), que son producidas por los fibroblastos y macrófagos. Estas citocinas son las responsables de que en la artritis reumatoide se produzca inflamación y destrucción articular ya que estimulan la producción de moléculas de adhesión e inducen la síntesis de enzimas proteolíticas que originan la destrucción del cartílago y del hueso. La interacción entre antígenos y anticuerpos en la articulación origina la alteración de la composición del fluido sinovial, el cual se hace rico en citosinas proinflamatorias y enzimas proteolíticas potencialmente dañinas para el cartílago articular, por lo que pierde capacidad para realizar sus funciones fisiológicas.(Tercero y Olalla, 2010)

Estos cambios que presentan el sinovio y el fluido sinovial son responsables en gran medida de la destrucción articular y de los tejidos blandos. Además la destrucción del hueso puede conducir a la laxitud de los tendones y de los

ligamentos. La destrucción ósea se produce en zonas donde el cartílago hialino y la membrana sinovial no recubren adecuadamente el hueso. En fases avanzadas de la enfermedad, el cartílago articular puede perder su estructura disminuyendo su densidad, lo cual origina una incapacidad para contrarrestar las fuerzas normales aplicadas sobre la articulación.

5.3. CRITERIOS DE DIAGNÓSTICO DEL COLEGIO AMERICANO DE REUMATOLOGÍA

El Colegio Americano de Reumatología estableció en 1987 los 7 criterios de diagnóstico de la artritis reumatoide. Estos criterios tienen buena sensibilidad y especificidad para clasificar la enfermedad ya establecida. Se considera el diagnóstico de artritis reumatoide cuando están presentes 4 o más criterios de los 7 siguientes:

- Rigidez articular matutina de al menos una hora de duración.
- Artritis de tres o más grupos articulares. Inflamación simultánea de al menos tres grupos articulares objetivada por un médico. los catorce grupos articulares son: interfalángicas proximales, metacarpofalángicas, muñecas, codos, rodillas, tobillos y metatarsofalángicas.
- Artritis de articulaciones de las manos. Inflamación de al menos un grupo o área articular en las manos (carpo, meta-carpofalángicas, interfalángicas proximales).
- Artritis simétrica. Afectación simultánea del mismo grupo articular en ambos lados del cuerpo.
- Nódulos reumatoides. Nódulos subcutáneos en prominencias óseas, en superficies de extensión o en zonas yuxtaarticulares, observados por un médico
- Factor reumatoide en suero. Presencia de valores elevados de factor reumatoide.
- Alteraciones radiológicas típicas de artritis reumatoide en radiografías posteroanteriores de las manos. Debe existir erosión u osteoporosis yuxta-articular clara y definida en las articulaciones afectadas. Estos criterios funcionan peor en la enfermedad de reciente comienzo.

En esta etapa los criterios clínicos (del primero al cuarto) son sensibles pero poco específicos de artritis reumatoide, mientras que el resto son poco sensibles aunque muy específicos. De las pruebas biológicas actuales, el factor reumatoide y los anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados son los que presentan una mayor utilidad diagnóstica en la enfermedad de reciente comienzo. Un líquido sinovial inflamatorio confirma el diagnóstico de artritis, pero es poco específico de la artritis reumatoide. Los reactantes de fase aguda, velocidad de sedimentación globular y proteína C reactiva reflejan la presencia e intensidad de un proceso inflamatorio pero no son específicos de la artritis reumatoide. La detección del factor reumatoide en un paciente con poli artritis hace probable el diagnóstico de artritis reumatoide, pero su ausencia no la excluye (su sensibilidad oscila entre 40-80%). El factor reumatoide tiene un valor pronóstico, ya que se asocia a enfermedad más grave con más extensión del compromiso articular, mayor destrucción y discapacidad. Puede aparecer años antes de la aparición de los síntomas de la artritis. Los anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados tienen una sensibilidad similar a la del factor reumatoide para el diagnóstico de la artritis reumatoide, pero mayor especificidad (95%). Su aparición puede preceder en años a la enfermedad y se relaciona con su pronóstico evolutivo. (Tercero y Olalla, 2010)

5.4. FISIOPATOLOGÍA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

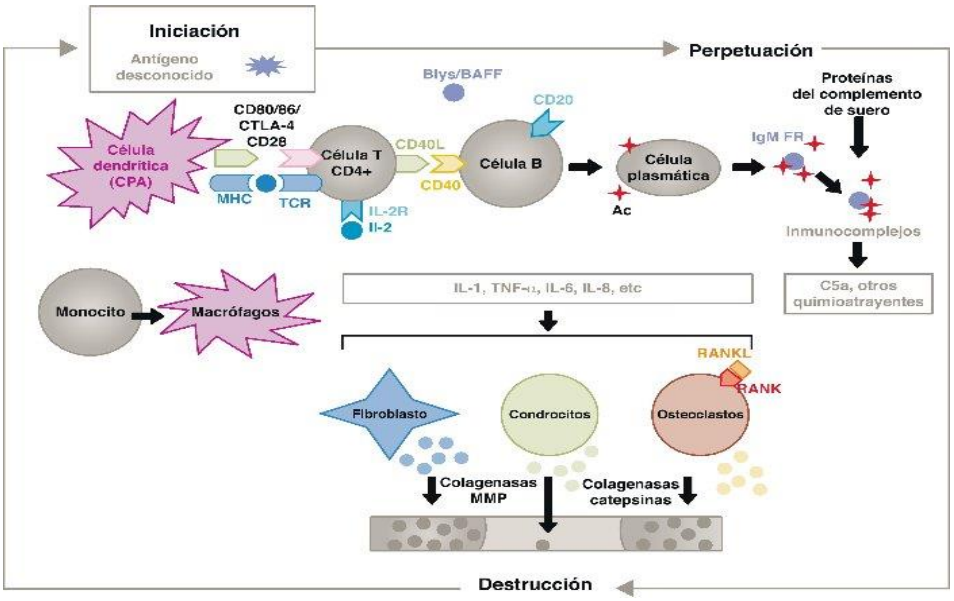


Figura 2. Fisiopatología de la artritis reumatoide. Esquema fisiopatológico general de la artritis reumatoide. AC: anticuerpo; BAFF: factor activador de células B; Blys: estimulador de linfocitos B; CD: cúmulo de diferenciación; CPA: célula presentadora de antígeno; CPH: complejo principal de histocompatibilidad; CTLA4: antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico; C5a: fracción 5a del complemento; FR: factor reumatoide; Ig: inmunoglobulina; IL: interleucina; MMP: metaloproteasas de la matriz; RANK: receptor activador del factor nuclear _appa B; RANKL: ligando de receptor activador para el factor nuclear _appa B; RCT: receptor de linfocitos T; TNF: factor de necrosis tumoral. Tomado de (Herreo - Beaumont et al., 2012)

El proceso inflamatorio está mediado fundamentalmente por la producción de mediadores solubles, en su mayoría citocinas, pero también factores de crecimiento y quimiocinas, cuyo efecto final es la destrucción del cartílago y el hueso subyacente, así como diversas manifestaciones extra articulares. Las citocinas son proteínas o glucoproteínas de bajo peso molecular (< 30 kD) con vida media corta, producidas principalmente por las células del sistema inmunológico, así como también por determinadas células de otros tejidos, y son mediadores fundamentales de la transmisión de señales

intercelulares. Los factores etiológicos de la AR son poco conocidos, pero se ha avanzado mucho en el estudio de los mecanismos que intervienen en su fisiopatología. En la membrana sinovial que tapiza la superficie articular y las vainas tendinosas se produce una infiltración por diversas células inflamatorias, entre las que los linfocitos Th17, secretores de la citocina con mayor efecto proinflamatorio, la interleucina (IL-17), parecen desempeñar un papel iniciado, interaccionando con células dendríticas (CD), macrófagos y linfocitos B. Los macrófagos son células fundamentales en la fisiopatología y la magnitud de su infiltración se correlaciona con los síntomas, probablemente debido a la secreción de mediadores proinflamatorios claves, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF_) y la IL-1, implicadas en la perpetuación de la inflamación crónica en la AR(Isaacs, 2010)(Hamilton, 2009). Los fibroblastos sinoviales son inicialmente activados por el microambiente local y posteriormente adquieren un fenotipo seudomaligno con regulación al alta de oncogenes, inhibición de la apoptosis y secreción de citocinas, quimiocinas, metaloproteinasas de la matriz y catepsinas, que median el proceso inflamatorio crónico y catalizan la destrucción articular (Chang y Brenner 2010). Los linfocitos B actúan mediante la producción de autoanticuerpos (células plasmáticas sinoviales), como células activadoras de los linfocitos T en su función de células presentadoras de antígeno (APC) y de activación de fibroblastos mediante la secreción de TNF- y linfotoxina. Además, se forman folículos linfoides en el tejido sinovial, lo que sugiere que la presentación de antígenos tiene lugar localmente, mientras que en otros pacientes los linfocitos B se distribuyen en agregados o difusamente. Por último, se produce una activación e hiperplasia de los mastocitos a nivel articular. El tejido inflamatorio o pannus adquiere la capacidad de invadir y destruir el cartílago articular adyacente. La activación de los osteoclastos del hueso periarticular conduce a la resorción y se forman las erosiones óseas características de la enfermedad (Hamilton, 2009). La función de las células T CD4+ reguladoras está disminuida, lo que contribuye al desequilibrio entre los brazos efector y regulador de la inmunidad.

La angiogénesis se refiere a la formación de nuevos capilares o neovascularización a partir de vasos preexistentes, a diferencia de la vasculogénesis o formación de capilares de novo a partir de células precursoras endoteliales. La angiogénesis es un proceso precoz y crítico en la fisiopatología de la AR, que depende de la activación, la migración y la proliferación de células endoteliales, con un papel importante de la IL-17.La

AR puede afectar también otros órganos o sistemas, induciendo inflamación y fibrosis, arteriosclerosis precoz o manifestaciones sistémicas, como astenia marcada, anemia y osteoporosis, causa importante de morbilidad y mortalidad en estos pacientes.

La citosinas proinflamatorias actúan como moléculas efectoras fundamentales: el TNF- y la IL-1 son los principales componentes del proceso inflamatorio y parecen actuar sinérgicamente, por lo que se definieron como las primeras dianas terapéuticas. El TNF-_ es un estímulo importante para las células productoras de mediadores inflamatorios (citocinas, metaloproteinasas, óxido nítrico, prostaglandina E2, etc.), mientras que la IL-1 media la destrucción de cartílago y hueso (a través de la secreción de metaloproteinasas, disminución de la síntesis de glucosaminoglucanos, etc.). Los inhibidores naturales de las citosinasproinflamatorias, tales como el antagonista del receptor de la IL-1 (IL1-Ra), sIL1-RI, sIL1-RII, sTNFRI, sTNF-RII, están incrementados, pero no lo suficiente como para contrarrestar el efecto antiinflamatorio. Las terapias biológicas disponibles en la actualidad, dirigidas fundamentalmente frente a citocinas o a moléculas expresadas en determinadas células implicadas en la etiopatogenia de la AR, hantransformado radicalmente la evolución de la enfermedad, permitiendo a los pacientes mantener su independencia funcional y mejorando su calidad de vida. El mayor reto actual consiste en identificar biomarcadores que permitan un diagnóstico más precoz, marcadores pronósticos y nuevas dianas terapéuticas más eficaces que permitan optimizar el tratamiento de manera individualizada (Isaacs, 2010)

5.5. ACTIVACIÓN DE LAS CELULAS T

En los últimos años se han identificado nuevas moléculas y dianas terapéuticas cuyo bloqueo podría aminorar o suprimir la respuesta inflamatoria crónica. Una de estas nuevas moléculas es abatacept. El abatacept es un constructo proteico, totalmente humanizado, formado por el dominio extracelular del antígeno 4 asociado al linfocito-T citotóxico humano (CTL4) y un fragmento genéticamente modificado de la región Fc de la inmunoglobulina humana G1 (IgG1), que inhibe la coestimulación de las

células T actuando sobre el verdadero núcleo inicial de la respuesta inmunitaria y, por tanto, en el inicio de la enfermedad.

La activación inmunitaria eficaz de las células T requiere de la participación de dos grupos de receptores de membrana en las células presentadoras de antígeno (CPA)(Yamada, 2002)

El primero es el vehículo que utilizan las CPA para ofrecer a la célula T un antígeno específico previamente procesado por la célula. A pesar del enorme esfuerzo dedicado a esta investigación, todavía no se ha podido identificar el/los antígenos artritogénicos desencadenantes de la AR (Choy y Panayi 2001). La presentación por la CPA de un antígeno, frente al que desencadenar una respuesta inmunitaria específica, al linfocito T se organiza a través de un complejo trimolécular que conforman: moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) presentes en las CPA, el antígeno frente al que se desarrolla la respuesta inmunitaria y un receptor de membrana en la célula T (RCT) específico para ese antígeno(Yamada, 2002)(señal o vía de señalización 1 de la respuesta inmunitaria).

Para promover la activación completa de la célula T es necesario un segundo bloque de comunicación intercelular entre las CPA y los linfocitos T, que se produce a través de las vías coestimuladoras y constituyen la denominada señal 2 de la respuesta inmunitaria. Aunque existen varias vías coestimuladoras, una fundamental es la que resulta de la unión de los receptores CD80 (B7-1)/CD86 (B7-2) en la membrana de las CPA y el receptor CD28 en los linfocitos T(Martín, 2006)(Dubois, 2009).

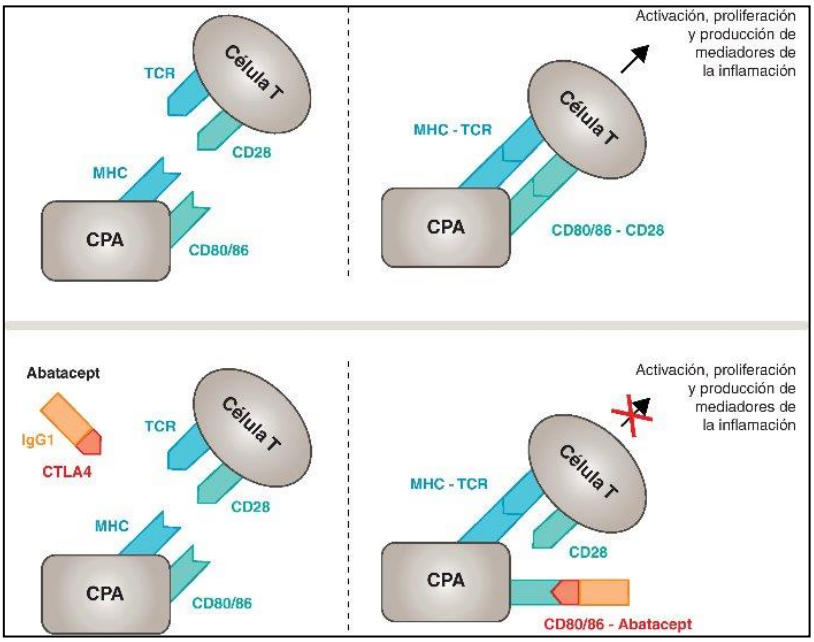


Figura 3: Mecanismo de acción del abatacept. El fragmento del abatacept constituido por el dominio extracelular del CTLA4 se une a los receptores CD80/CD86, evitando o desplazando su interacción con el receptor CD28. De esta forma se bloquea selectivamente la unión específica de los receptores CD80/CD86 al CD28, lo que equivale, fisiopatológicamente, a bloquear la segunda señal de la activación inmunitaria y, por tanto, la activación de las células T. CPA: célula presentadora de antígeno; CPH: complejo principal de histocompatibilidad; RCT: receptor de células T(Herreo - Beaumont et al., 2012)

La activación simultánea de ambas señales, 1 y 2, desencadena una intensa señalización intracelular en los linfocitos T, imprescindible para su activación completa, proliferación, supervivencia y producción de citocinas. A las 24-48 h de producirse la activación de los linfocitos T, la misma señalización intracelular inicia un mecanismo regulador que tiene como objetivo la desactivación de la propia respuesta. Así se induce la expresión en la membrana celular linfocitaria del CTLA4(Perkins et al., 1996) con la misión de competir con el CD28 dada su mayor afinidad de unión al CD80/CD86. La activación de los dos subgrupos de células T, CD4+ y CD8+ndepende de la coestimulación del receptor CD28. Las células T CD4+ son las células T

colaboradoras. Éstas, reconocen los péptidos ofrecidos por las moléculas de la clase II del CPH presentes en las CPA.

Estos antígenos se originan a partir de la vía exógena que procesa patógenos como las bacterias. Muchas enfermedades autoinmunes se asocian a una respuesta patológica de las células T CD4+. Por su parte, las células T CD8+ son los linfocitos citotóxicos (LCT). Los receptores de las células T CD8+ reconocen antígenos, principalmente virales y tumorales, presentados por moléculas de clase I del CPH. Tras su activación, las células CD8+ median la destrucción de las células diana mediante la producción de perforina, granzimas e interferón (IFN).

Ambos subtipos de células T son activados mediante la coestimulación con CD28(Janeway, 2005), aunque la activación de las células T CD8+ es menos dependiente de esta vía de coestimulación. De hecho, mientras todas las células CD4+ expresan el receptor CD28 en su membrana, esto sólo ocurre en alrededor del 50% de las CD8 +(Rochford et al, 2004). Además, las células CD4+ han demostrado exhibir una mayor respuesta a la unión a (Korhonen, 2009)CD28. Por otra parte, el activador CD28 no es un requisito absoluto para la activación de LCT(Van Gool et al., 1996). Todo lo cual aportaría un doble beneficio terapéutico en la práctica clínica. Por un lado, abatacept actúa preferentemente sobre la célula diana de la patogenia de la enfermedad. Por otro, la acción reducida sobre la actividad de los linfocitos CD8+ aseguraría un mejor perfil de seguridad en cuanto a complicaciones virales y tumorales.

La activación de las células T CD4+ es el punto de partida de una cascada de fenómenos proinflamatorios con producción de gran cantidad de citocinas y proliferación celular que, en caso de perpetuarse de forma mantenida, como ocurre en la AR, da lugar a una inflamación crónica muy activa, capaz de destruir los tejidos en los que se desencadena, principalmente en las articulaciones en el caso de la AR. En la membrana sinovial comienzan a proliferar las células infiltrantes provenientes de la sangre, como los propios linfocitos T y sus subtipos, y también los linfocitos B. Los monocitos se diferencian en macrófagos y osteoclastos y, además, activan a los condrocitos articulares. En este medio se producen grandes cantidades de citosinas proinflamatorias como la interleucina (IL)-1, la IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF) entre otras muchas. Las células B producen también autoanticuerpos como el factor reumatoide o los anticuerpos

antipéptidoscitrulinados. Todo lo cual conduce a la destrucción no sólo de la membrana sinovial, sino también del hueso subyacente y del cartílago articular (Korhonen, 2009).

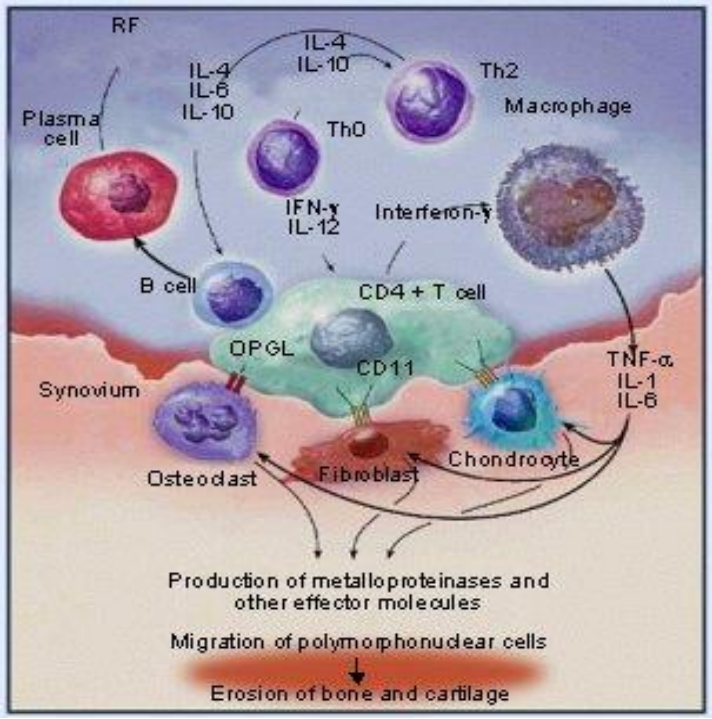


Figura 4: Cadena de señales de la Artritis Reumatoide.(Choy, Penayi, 2001)

5.6. GENÉTICA DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

Se ha estimado que el componente genético de la AR supone aproximadamente un 60% de los factores desencadenantes de la enfermedad(MacGregor et al., 2000).La presencia de agregación familiar fue la primera evidencia de susceptibilidad heredada a la AR. La prevalencia de la AR puede aumentar hasta un 12% en familiares directos de los pacientes, mientras que en la población general es del 1% aproximadamente (Dieude y Cornelis, 2005). La agregación familiar se calcula se cuantifica mediante el coeficiente o riesgo relativo hermanos, definido como el coeficiente de

prevalencia de la enfermedad en hermanos de pacientes de AR entre la prevalencia de la población general.

5.7. DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

El diagnóstico de la enfermedad depende básicamente de las manifestaciones clínicas con un apoyo serológico relativamente limitado. La única prueba de laboratorio utilizada rutinariamente en el diagnóstico de AR es la determinación del factor reumático en suero (FR), un tipo de anticuerpo dirigido hacia la región constante de la IgG. Sin embargo, éste puede ser detectado en pacientes con otras enfermedades autoinmunes y en la población normal con una menor frecuencia.

Además del FR, otros anticuerpos que se pueden hallar en el suero de pacientes con AR son los anticuerpos antiperinucleares (APF) con una frecuencia de 49-91% y los anticuerpos antiqueratina (AKA). Los APF pueden estar presentes en la enfermedad en forma muy temprana y por lo tanto pueden ser considerados como posibles marcadores pronósticos. Se ha establecido que los APF y los AKA reconocen la proteína Filagrina (proteína agregante de filamento) extraída de la epidermis humana. No obstante, se desconoce aún la razón por la cual un antígeno de la piel sería el blanco relativamente específico en un desorden que es primariamente de origen articular.

Una posible explicación puede estar relacionada con la demostración de que la citrulina parece ser un constituyente esencial de los determinantes antigénicos reconocidos por AKA y APE La molécula de (pro) Filagrina -rica en citrulina- se convierte entonces en un sustrato ideal para la detección de esta reactividad.

Estudios recientes han revelado que los anticuerpos APF y AKA se unen específicamente a péptidos sintéticos que contienen el aminoácido citrulina, un residuo de arginina modificado y pueden ser medidos usando un ELISA basado en péptidos sintéticos que contienen citrulina. Los anticuerpos anti-péptidos citrulinados cíclicos (anti- CCP) son al parecer muy específicos para

la AR y están presentes en al menos 60-75% de las pacientes estudiados, con una especificidad de 95-100%. Esta alta especificidad combinada con su presencia temprana en la enfermedad, incluso antes de que la enfermedad sea manifiesta, sugiere un papel importante de estos anticuerpos en la patogénesis de la AR.

Estudios previos han mostrado generalmente un alto grado de correlación entre APF, AKA y anti-CCP en pacientes con AR. Así, los anti-CCP parecen constituir un nuevo e importante marcador para el diagnóstico de AR aunque su valor predictivo todavía se desconoce. Los anticuerpos presentes en forma temprana en la enfermedad, han sido evaluados principalmente por su valor diagnóstico. Hasta la fecha ningún anticuerpo individual ha demostrado un adecuado valor pronóstico para ser tomado como base en decisiones clínicas. De acuerdo con el trabajo de kroot et al, los pacientes cuyo suero resultó positivo por anti-CCP presentan mayor daño radiológico después de seis años de seguimiento, comparados con pacientes anti-CCP negativos. El valor predictivo de anti-CCP disminuye cuando se combina con otros factores pronósticos.

Resulta necesario mencionar que a pesar de la correlación con AR de los anticuerpos mencionados, los precursores anti-CCP no solo se encuentran presentes en la circulación de pacientes con AR, sino también en el repertorio de células B de individuos sanos. La capacidad de las células B de sangre periférica de producir niveles aumentados de anti-CCP en pacientes con AR comparados con controles normales, sugiere una frecuencia mayor de células precursoras o la presencia de células anti-CCP que responden más fuerte luego de un estímulo. Además, tanto la médula ósea como el compartimento sinovial, contienen una población de células B que contribuyen activamente con la circulación de anticuerpos anti-CCP (Villegas, 2003).

5.8. MARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ARTRITIS REUMATOIDE

En los criterios diagnósticos o de clasificación de la AR que se han venido utilizando hasta la actualidad (criterios ACR 1987) sólo se incluye un biomarcador que es el factor reumatoide (FR).

Este anti- cuerpo dirigido contra la fracción constante de la inmunoglobulina G se descubrió hace ya más de 50 años y ha constituido un elemento importante para el clínico como ayuda diagnóstica y marcador pronóstico en la AR. No obstante, su relativa falta de especificidad ha condicionado su uso e interpretación en la práctica clínica. Sin duda, el principal y más importante avance en el descubrimiento de nuevos biomarcadores en la AR han sido los denominados anticuerpos frente a péptidos/proteínas citrulinados (ACPA), que para algunos autores serían los verdaderos «factores reumatoides» por su gran especificidad, mucho más elevada que la del FR, aunque no sean patognomónicos de la enfermedad. Los ACPA presentan hoy en día como los autoanticuerpos con un mejor balance sensibilidad/especificidad para el diagnóstico de la AR.

Anticuerpos inespecíficos	Anticuerpos específicos
Factor reumatoide	Anticuerpos contra GPI
Anticuerpos antinucleares	Anticuerpos contra Sa
Anticuerpos contra la cardiolipina	Anticuerpos contra la queratina
Anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos	Anticuerpos contra el factor perinuclear
Anticuerpos contra el colágeno II	Anticuerpos contra la filagrina
Anticuerpos contra RA33	Anticuerpos contra los péptidos citrulinados

Tabla 1:Autoanticuerpos estudiados como marcadores serológicos de la artritis reumatoide. (Según Ruiz- Alegria et al., 2003).

La importancia de los ACPA como marcadores diagnósticos queda bien reflejada en los recientemente consensuados nuevos criterios de clasificación ACR/EULAR de la AR. En estos nuevos criterios aparecen, en comparación con los de la ACR de1987, además de los reactantes de fase

aguda (PCR y VSG), los ACPA, situándose a un nivel equiparable al del FR. Diferentes estudios han demostrado la gran utilidad de los ACPA como marcadores predictivos de evolución o diagnóstico de la AR en aquellos pacientes que se presentan en las consultas o clínicas de artritis de inicio como artritis indiferenciadas o inclasificables (Sanmartí y Gómez , 2011.)

Otros anticuerpos se han asociado también con la AR, específicamente: (i) anticuerpos antifactorperinuclear (AFP) ; (ii) anticuerpos antiqueratina (AKA); (iii) anticuerpos anti- Sa , cuyo antígeno Sa se ha identificado como un complejo hapteno-acarreador en donde la citrulina es el determinante antigénico (epitopo) y la vimentina es el acarreador. Los anticuerpos frente a Sa se han descrito en aproximadamente 40% de pacientes con AR, y en el 50% de pacientes con AR crónica, y en cerca del 25% de pacientes con AR de aparición reciente, y (iv) anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados (anti-PCC) de gran sensibilidad (80%) y especificidad (98%) en pacientes con AR, los cuales se presentan en etapas tempranas de la enfermedad. El antígeno reconocido por los anticuerpos AFP y AKA es el mismo y corresponde a profilagrina, la cual se expresa en diferentes sustratos. Actualmente, estos anticuerpos se denominan anticuerpos antifilagrina o antiprofilagrina.

La Filagrina es una proteína epidérmica que une los filamentos intermedios de la queratina y promueve la formación de puentes disulfuro entre los filamentos intermedios durante las fases terminales de diferenciación de las células epiteliales de los mamíferos, que es sintetizada como un precursor proteico, la profilagrina, que contiene entre 10 y 12 moléculas de Filagrina .La vimentina, un candidato interesante como autoantigeno en la AR, es una proteína fibrosa que forma los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular en particular de células embrionarias, endoteliales, y sanguíneas, que se expresa ampliamente, y que puede estar involucrada principalmente en procesos estructurales, como la cicatrización de heridas. Los macrófagos activados secretan vimentina en el espacio extracelular. La citocinaproinflamatoria factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) puede incitar la secreción de vimentina, mientras que la citocina antiinflamatoria interleucina 10 (IL-10), bloquea su secreción (López, 2005.)

5.9. CITRULINACIÓN EN ARTRITIS REUMATOIDE

La citrulina es un aminoácido ubicuo no tradicional que no se incorpora a las proteínas durante la traducción. La Citrulinación constituye un cambio postraduccional producido por la peptidil arginina deiminasa (PAD) sobre residuos de arginina. Los anticuerpos antiproteínas citrulinadas fueron inicialmente descritos como antifactorperinuclear (APF) y posteriormente como anticuerpos antiqueratina (AKA) y anti-filagrina (AFA), hasta la identificación del antígeno común, la citrulina. Las proteínas que se han identificado como blancos citrulinados para los anticuerpos son diversas, entre las cuales la principal es la filagrina, incluyéndose también la vimentina y fibrina (Mezzano y Lacobelli., 2007).

Las modificaciones postraduccionales (MPT) son cambios químicos que sufren las proteínas después de ser sintetizadas. Una de las MPT es la citrulinación (conversión del residuo arginina a citrulina), la cual es catalizada por la enzima peptidil arginina deaminasa (PAD), de la que se han identificado 5 isoformas de la PAD con expresión diferencial en tejidos y órganos. Las isoformas de la PAD están ampliamente distribuidas en los tejidos de mamíferos. PAD1 se expresa predominantemente en la epidermis y útero; PAD2 es el miembro más ubicuo de la familia y se expresa en músculo esquelético, bazo, cerebro, glándulas salivales, útero, etc.; PAD3 se expresa en folículos; PAD4 se expresa en neutrófilos y eosinófilos, en tanto que la PAD6 ha sido detectada en ovarios, testículos y leucocitos de sangre periférica. El estudio de la citrulinación de proteínas ha adquirido gran interés debido a su participación en diversos procesos, tanto fisiológicos como patológicos. Dentro de los procesos fisiológicos, se incluye la diferenciación terminal de células epiteliales, la regulación en la expresión de genes y la apoptosis; en tanto que en los procesos patológicos, las proteínas citrulinadas se han relacionado con la progresión de la enfermedad en AR, esclerosis múltiple y Alzheimer, entre otros.

La conversión de arginina en citrulina es capaz de activar la respuesta inmune. Dicha conversión da como resultado un cambio en la carga del aminoácido. A nivel proteico, la reacción provoca una reducción en la masa molecular de aproximadamente 1,0 Da, por cada arginina modificada. La carga positiva se pierde, por lo que el punto isoeléctrico (pI) también se ve

modificado y las interacciones con otras proteínas también pueden verse afectadas.

En autoinmunidad, la expresión de PAD4 se ha asociado con el desarrollo de manifestaciones clínicas de AR. Recientemente, se ha demostrado que la presencia de anticuerpos contra proteínas citrulinadas, así como la expresión de PAD4, preceden a la aparición de manifestaciones clínicas en AR. Por otro lado, también se han detectado PAD2 y proteínas citrulinadas en el líquido sinovial de pacientes con AR y espondiloartritis (EA); lo que sugiere que la citrulinación es un proceso asociado a la inflamación, pero la generación de anticuerpos patogénicos que reconocen proteínas citrulinadas es un proceso específico de la AR. Otro aspecto importante en relación a la expresión de PAD4 es la asociación de ciertos polimorfismos con el desarrollo de AR.

En el 2003, Suzuki et al, estudiaron en población japonesa polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y observaron asociación entre haplotipos funcionales del gen padi4 con AR. Identificaron 4 haplotipos de padi4, de los cuales 1 y 2 tuvieron una frecuencia del 82%; en tanto que 3 y 4, del 18%. El 32% de los pacientes con AR presentaron el haplotipo 2 en comparación con el 25% de sujetos sanos, y la diferencia era significativa (p=0,000008). La razón por la cual el haplotipo 2 de la padi4 puede incrementar la susceptibilidad para AR no se conoce. Sin embargo, se sabe que el tiempo de vida media del ARNm del haplotipo 2 es de 11,6 min y el del haplotipo 1 es de solo 2,1 min; por lo que la susceptibilidad puede ser explicada por la alta posibilidad de traducción de la PAD, resultando en una mayor cantidad de enzima y consecuentemente en un aumento en la citrulinación de proteínas (fibrinógeno o vimentina). Esto podría estimular tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa, permitiendo de esta manera el desarrollo de inflamación crónica (Olivares et al., 2009)

La citrulinación no es un evento específico de la membrana sinovial, sino que se puede ver en diversos tejidos asociada a inflamación, como en músculos de pacientes con polimiositis, tejido colónico en pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales y amígdalas en pacientes con tonsilitis crónica (Makygiannakis et al., 2006). En cambio, es específica la respuesta humoral a la citrulinación, con producción de autoanticuerpos sólo en AR. Estos anticuerpos serían producidos localmente por células plasmáticas contra proteínas citrulinadas de la sinovial inflamada. Estos anticuerpos se pueden

encontrar tanto en líquido sinovial como en la sangre; los valores en ambos fluidos se correlacionaría (Vossenaar et al., 2004).

Se le ha atribuido a la citrulinación un papel patogénico, vinculándola al epítope compartido del HLA. En la presentación antigénica a las células T la presencia de alelos HLA-DRB1 *0401 confiere especial susceptibilidad para el desarrollo de la AR. Si bien no se ha identificado con precisión un antígeno gatillante de la respuesta inmune correspondiente, el grupo de aminoácidos que conforman el epítope compartido forman un bolsillo, P4, en el cual el encaje de la citrulina sería específico y mantenido por la neutralidad de la molécula, en comparación con la carga positiva de la arginina.

Recientemente también se ha descrito una asociación entre isoformas de la PAD, específicamente PAD4, y la propensión al desarrollo de la AR en algunas poblaciones(Suzuki et al., 2003). Se ha descrito también una mayor susceptibilidad para el desarrollo de anticuerpos anti-PCC en individuos portadores de alelos del epítope compartido HLA-DRB1 gatillado por el estímulo ambiental del tabaquismo. Esta asociación tabaco-desarrollo de anti-PCC no se evidenció en pacientes no portadores de epítope compartido. Estas observaciones sugieren caminos patogénicos distintos en la AR con y sin anti-PCC.

5.9.1. PROTEINAS CITRULINADAS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE

En 1964, Nijenhuis y Mandema describieron por primera vez los anticuerpos AFP en pacientes con AR. En 1979, Young demostró que los sueros de pacientes con AR reaccionaban contra el epitelio de esófago de rata y definió a estos anticuerpos, como anticuerpos AKA. Ambos autoanticuerpos, detectados mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta, mostraron alta especificidad en AR (94% aproximadamente). Sin embargo, debido a la sensibilidad limitada (40–55%), a las dificultades técnicas para su determinación y a la falta de estandarización de las técnicas utilizadas, el estudio de los autoanticuerpos AFP y AKA fue exclusivo de trabajos de investigación y laboratorios de inmunología especializados. En 1995, Sebbag et al mostraron que tanto los anticuerpos AKA como los AFP reconocen moléculas relacionadas con la filagrina y la profilagrina (Sabbag et al., 1995). Posteriormente, observaron que los sueros de pacientes con AR

presentaban una mayor reactividad contra profilagrina in vitro. Sin embargo, en estudios posteriores en los que se utilizó filagrina recombinante o fragmentos de péptidos sintéticos de profilagrina, los sueros de pacientes con AR no mostraron reactividad. Lo anterior sugirió que la inmunogenicidad de la filagrina y la profilagrina estaba relacionada con MPT. En el mismo trabajo, Girbal-Neuhaser demostró que el antígeno reconocido por los anticuerpos AKA y AFP era la profilagrina citrulinada. Sin embargo, un estudio detallado reveló que no hay expresión in vivo de profilagrina en tejidos sinoviales. Esto excluyó la posibilidad de que el antígeno reconocido in vivo por los AKA y AFP fuera la profilagrina, ya que la inflamación solo ocurre en las articulaciones y no en la epidermis, donde la profilagrina se expresa en mayor abundancia (Masson et al., 2001). Trabajos posteriores mostraron que tanto la cadena _ como la _ de la fibrina citrulinada son los antígenos reconocidos por los anticuerpos APC y que están presentes en pacientes con AR.

Debido a la importancia de la detección de los APC, existen diversos estudios relacionados con la identificación de estos o de los antígenos citrulinados predominantes. Se han descrito distintas proteínas citrulinadas con alta especificidad para AR, entre las que se encuentran las colágenas tipo I y II (CI y CII), fibrinógeno y vimentina. Matsuo et al analizaron el perfil proteómico del tejido sinovial de un paciente con AR y detectaron 51 proteínas citrulinadas, de las cuales 30 (58,8%) fueron antigénicas. Trece de las 30 proteínas fueron identificadas como derivados del fibrinógeno, la asporina y la subunidad _ de la proteína de unión a actina-F (CapZ_-1). Además, detectaron anticuerpos contra CapZ_-1 en 16 de los 30 sueros de pacientes con AR (53,3%), en 2 de los 28 de pacientes con osteoartritis (7,1%) y en 2 de los 31 de sujetos sanos (6,5%) (Masson et al., 2001). Otro antígeno importante, reportado como blanco de los APC, es la enolasa citrulinada, la cual fue identificada mediante inmunohistoquímica en cortes de tejido sinovial de pacientes con AR. Kinloch et al en 2005 reportaron la presencia de anticuerpos contra la enolasa- en 46% de los sueros de pacientes con AR. Los datos publicados muestran la existencia de múltiples proteínas FC que son blanco de los APC, las cuales presentan diferentes sensibilidades y especificidades para el diagnóstico de AR.

6. METODOLOGÍA

6.1. Secuencias de péptidos usados en ELISA.

Para cumplir con el primer objetivo de la investigación, se realizó una búsqueda de las principales marcadores peptídicos que se tienen en cuenta en la actualidad para el diagnóstico de la Artritis Reumatoide, se llevó a cabouna revisión bibliográfica en las plataformas de Pub Med,Scielo, y ScienceDirect.

6.2. Alineamiento de secuencias conDelta-Blast.

Posteriormente se realizó el análisis de las secuencias de los péptidos usados, por medio de un alineamiento tipo Blast, con el fin de identificar las proteínas de donde provenían.

6.3. Predicción de estructura de las proteínas.

Con las proteínas identificadas se llevo a cabo la predicción de estructurapor medio de los servidores I-TASSER (algoritmo de tercera generación, el cual da como resultado dos o más estructuras, de las cuales se escoge la de mayor estabilidad identificada por sus menores valores de energía, por la inexistencia de ángulos no permitidos y por la similaridad con proteínas de la misma familia a nivel funcional); y el servidor QUARK (que es un algoritmo para predecir estructuras de proteínas y su plegamiento).

6.4. Análisis y comparación de secuencias en la proteína.

A partir de esta predicción, se comparó la conformación de la secuencia y se observó si era posible mejorar el péptido, acortando o aumentando residuos de la secuencia de referencia, que ayudaran a reproducir la conformación hallada en la predicción.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Identificación de secuencias usadas en ELISA.

Después de llevada a cabo la revisión bibliográfica, se identificaron unas secuencias, unas veces solas otras mezcladas, en los péptidos reportados por diferentes autores. Las secuencias de los péptidos usados en los ensayos de ELISA, se presentan a continuación:

Secuencia 1: HSTKRGHAKSRPVXG

Secuencia 2: ARGHXPLDKKREEAPSLXPA

Secuencia 3: HQCHGESTXGRSRGRCGRSGS

7.2. Alineamiento de secuencias con Blast.

Estas secuencias se analizaron con el programa DELTA-BLAST, para detectar homologías con secuencias de proteínas de las bases de datos de proteínas.

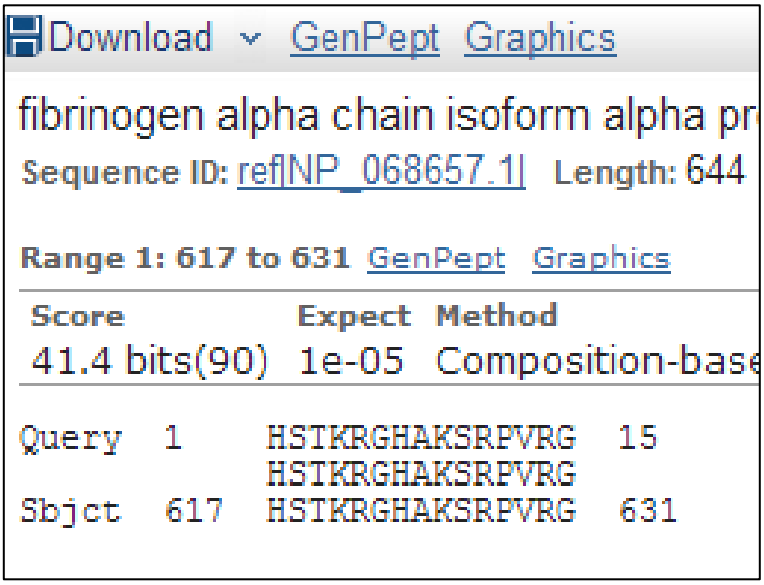


Figura 5. Alineamiento de la secuencia 1 con Delta-Blast

De acuerdo con Delta-Blast, la secuencia hace parte de la isoforma alfa de la proteína fibrinógeno, de 644 residuos de longitud, en la posición de residuos de la Histidina 617 a la Glicina 631.

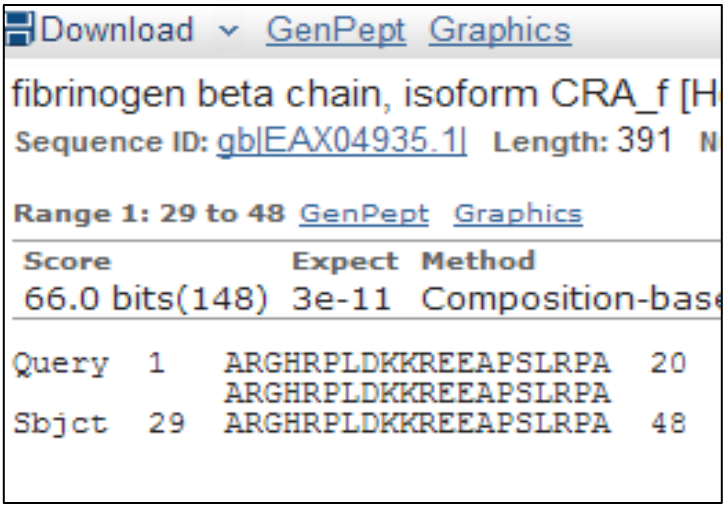


Figura 6. Alineamiento de la secuencia 2 con Delta-Blast

De acuerdo con Delta-Blast, la secuencia hace parte de la isoformaCRA_f de la proteína fibrinógeno beta, de 391 residuos de longitud, en la posición de residuos de la Alanina 29 a la Alanina 48.

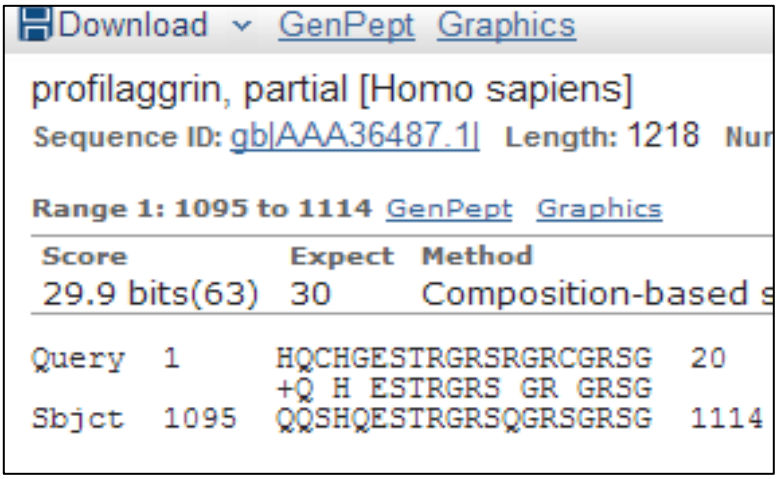


Figura 7. Alineamiento de la secuencia 3 con Delta-Blast

De acuerdo con Delta-Blast, la secuencia hace parte de la proteína profilagrina de Homo sapiens, de 1218 residuos de longitud, en la posición de residuos de la Glutamina 1095 a la Glicina 1114. Según el alineamiento, se presenta poliformismos en las posiciones 1095 (Glutamina Q por HistidinaH), 1097 (Serina S por Cisteína C),1099 (Glutamina Q por Glicina G), 1107 (Glutamina Q por Arginina R) y 1110 (Serina S por Cisteína C).

De los resultados obtenidos con el alineamiento, se encontró que las dos primeras corresponden a secuencias de las proteínas α-fibrina (644 aa) y β-fibrina (391 aa), con una homología del 100%, mientras para la proteína filagrina (1218 aa), se observa que los investigadores introdujeron cambios en la secuencia. Aunque en este caso específico no se indica la razón, algunos investigadores introducen cambios con el fin de mejorar la antigenicidad u obtener algún efecto estructural deseado.

7.3. Predicción de estructura de las proteínas y análisis de la secuencia.

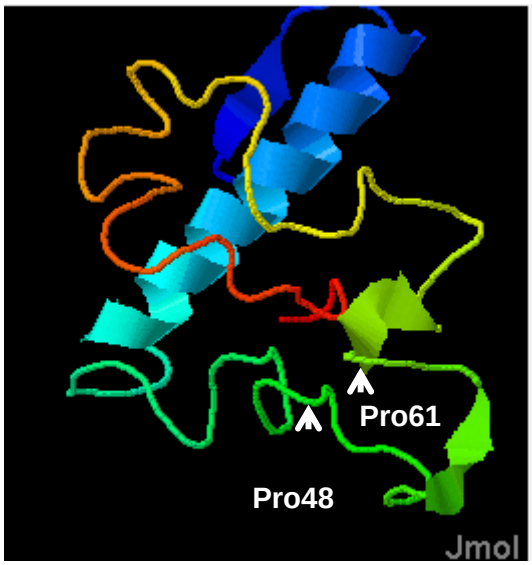


Figura 8. Estructura 3-D de la proteína β-fibrina usando QUARK.

La predicción usando el servidor QUARK (Xu y Col., 2012), mostró diez modelos posibles, de los cuales se escogió el modelo 10 por tener el valor de TM-score más alto (0.3673 ± 0.0764). El TM-score es una escala de medida de similaridad estructural entre dos estructuras, que da una estimación de la calidad de la predicción.

En la estructura se indica la distancia entre los residuos Pro_{48} y Pro_{61}. En el péptido propuesto por otros autores ARGHXPLDKKREEAPSLXPA, el primer aminoácido A (Ala_{43}) está bastante distante estructuralmente del último residuo A (Ala_{62}). Si analizamos la estructura secundaria de la proteína, encontramos que es bastante compleja para obtener mimos estructurales, pues de la Ala_{43} hasta la Ala_{62} solo se predice la tendencia conformacional a vueltas β (T, por β-Turn) y enrollamientos al azar (C, por RamdomCoil).

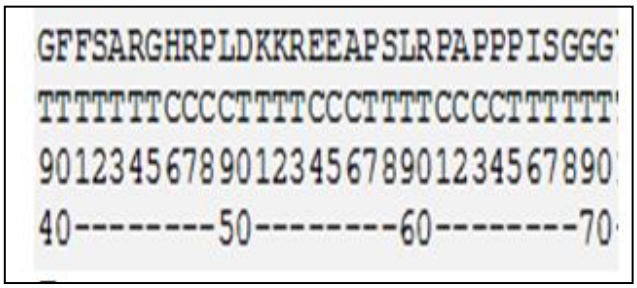


Figura 9. Estructura secundaria de la proteína β-fibrina (fragmento).

Para tener una idea más clara sobre los aminoácidos de la secuencia del péptido de referencia, se analizó la accesibilidad a solventes de la proteína en esa región. Esta accesibilidad puede ser un indicio de qué tan expuesta está la secuencia.

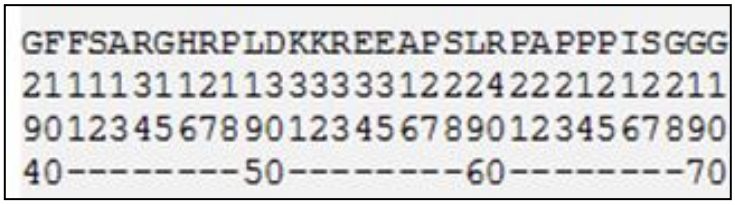


Figura 10. Predicción de accesibilidad a solventes de β-fibrina (fragmento).

Para el cálculo de la accesibilidad a los solventes, el valor 0 corresponde a residuos de aminoácido ocultos y el valor 9 a los totalmente expuestos. Se observa que para los primeros aminoácidos del péptido de referencia están casi ocultos, mientras que la secuencia observada en la estructura 3-D tiene un valor promedio de 3. Con base en estas observaciones, se propone el diseño de un péptido en el cual se reemplacen los aminoácidos Pro_{48} y Pro_{61} por cisteínas, y se eliminen los aminoácidos localizados antes y después de estos límites, para el diseño de un nuevo péptido cíclico, más corto, que se

obtiene al formar el puente disulfuro entre las cisteínas de sus dos extremos. La X indica que el aminoácido arginina se cambió por Citrulina:

Secuencia original: **ARGHXPLDKKREEAPSLXPA**

Secuencia del péptido propuesto: **C--LDKKREEAPSLX--C**

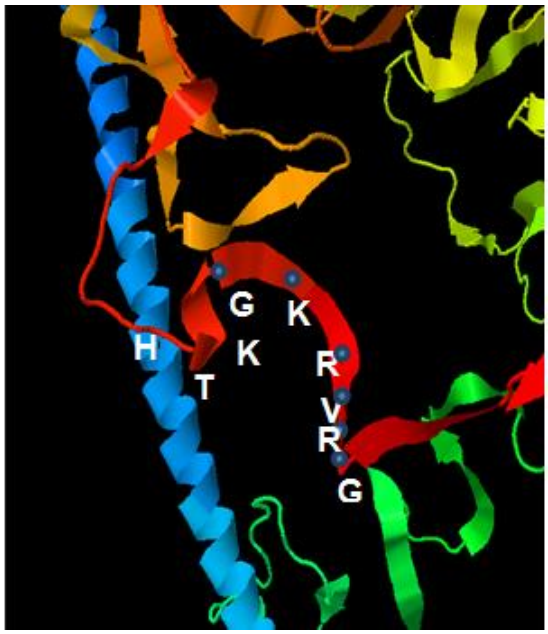


Figura 11. Estructura 3-D de la proteína α-fibrina con I-TASSER.

La predicción de estructura usando el servidor I-TASSER (Roy y Col., 2010), mostró 5 modelos posibles, de los cuales se escogió el modelo 5 por tener el valor de C-score más elevado (3.64). El coeficiente C-score es un valor de confianza para evaluar la calidad de los modelos predictivos por I-TASSER, y se basa en la significancia de la tendencia de matrices de alineamiento y los parámetros de convergencia de la estructura. El rango de C-score es de[-5,2], en donde un valor más elevado significa un mayor grado de confianza en la predicción.

En la estructura se observa que la menor distancia, desde el punto de vista conformacional, se encuentra entre Thr_{619} (T) o Lys_{620} (K) en un extremo del bucle y Gly_{631} (G) en el otro. Los dos primeros aminoácidos parece que no ayudaran desde el punto de vista conformacional por su lejanía y proyección.

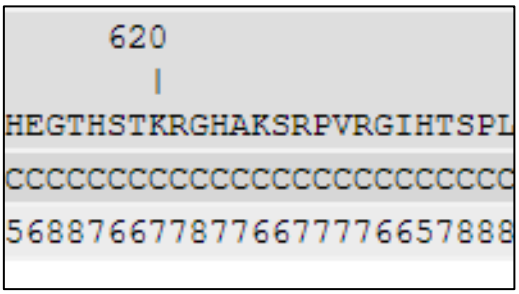


Figura 12. Estructura secundaria de la proteína α-fibrina (fragmento).

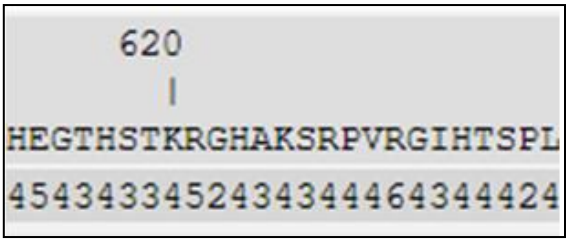


Figura 13. Predicción de accesibilidad a solventes de α-fibrina (fragmento)

Si analizamos, para el fragmento, la estructura secundaria (Fig. 12), encontramos que su tendencia conformacional es de enrollamiento aleatorio (C, por RamdomCoil).

Se analizó la accesibilidad a solventes de la proteína en esa región (Fig. 13), pero a diferencia del caso anterior, todo el fragmento presenta unos valores normales y, en especial, para las argininas (R).

Con base en estas observaciones, se propone el diseño de un péptido en el cual se eliminen los aminoácidos HST, se reemplace la última glicina (G) por una Lys y se cree un enlace entre las lisinas inicial y final para obtener un bucle que imite esta compleja subestructura:

Secuencia original: **HSTKRGHAKSRPVXG**

Secuencia péptido propuesto: **KRGHAKSRPVXK**

En cuanto a la proteína Filagrina, por su tamaño (1218 aa), no fue posible calcular su estructura 3-D y proponer un péptido para esta. En un estudio posterior se tratará de aplicar solo el estudio de estructura secundaria, para diseñar péptidos que se analicen indirectamente por medio de ensayos de ELISA.

8. CONCLUSIONES

Se halló, por alineamiento Delta-Blast, que los péptidos usados por otros investigadores provenían de las proteínasα- y β-fibrina y filagrina.

Se hizo la predicción de las estructuras secundaria y terciaria para la proteína β-fibrina usando el servidor QUARK, y para la proteína α-fibrina usando el servidor I-TASSER. Por su tamaño, no fue posible calcular la estructura de la proteína filagrina.

El análisis estructural para las proteínas α- y β-fibrina, muestra que es posible eliminar aminoácidos de las secuencias de referencia para facilitar el diseño de un péptido cíclico que imite mejor la estructura del segmento escogido.

Se diseñaron dos péptidos cíclicos, uno para cada una de las proteínas estudiadas.

9. RECOMENDACIONES

Sintetizar péptidos con las secuencias de referencias y las secuencias propuestas, para comparar su reactividad en ensayo de ELISA, frente a sueros de pacientes con artritis reumatoide. .

Comparar los resultados de los péptidos que muestren mayor reactividad en los ensayos de ELISA frente a las pruebas de diagnóstico clínico tradicionales, para ver si es posible incluir el uso de los péptidos como pruebas alternativas válidas,

10. BIBLIOGRAFÍA

Choy E, Panayi G. (2001) Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. N Engl J Med;344:907–16.

Chang et al. (2010). Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: the emerging role of cadherin-11. Immunol Rev;233:256–66.

Dubois EA, Cohen AF. (2009). New drug mechanisms. Abatacept. Br J ClinPharmacol; 68:480–1.

Dieude P, Cornelis F. (2005). Genetics basics of Rheumatoid Arthritis. Joint bone spine. Dec; 72(6):520-6

Hamilton JA, Tak PP. (2009). The dynamics of macrophage lineage populations in inflammatory and autoimmune diseases. Arthritis Rheum; 60:1210 21.

Isaacs JD.(2010).The changing face of rheumatoid arthritis: sustained remission for all? Nature Rev Immunol; 10:605–11

Janeway CA. et al. (2009). Immunobiology, The immune system in health and diseases. New York: Garland Science Publishing; 2005. p. 461–613

Korhonen R, Moilanen E. (2009).Abatacept, a novel CD80/86-CD28 T cell costimulation modulator, in the treatment of rheumatoid arthritis. Basic ClinPharmacol Toxicol;104:276–84.

López M. (2005) Anticuerpos contra los péptidos cíclicos citrulinados: Marcadores específicos de la Artritis Reumatoide. Hosp. Universitario Marqués de Sevilla. Ed ContLabClin; 9: 13-14

MacGregor AJ. et al.(2000) Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. Arthritis Rheum. Jan; 43 (1) : 30-7

Masson- Bessiere et al. (2001). The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of the alfa and beta- chains of fibrin. J Immunol. 2001; 166:4177-84.

Perkins et al. (1996). Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. J Immunol; 156:4154–9.

Sanmartí R, Gómez Puerta JA. (2011). Biomarcadores en la artritis reumatoide. ReumatolClin. Doi:10.1016/j.reuma.2010. 10. 007

Tercero Gutiérrez, M - Olalla Herbosa R. (2010). Artritis Reumatoide: Clínica y Arsenal Farmaco-terapeútico. VOL 29, Num 4.

Yamada A, et al. (2002). The role of novel T cell costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. J Am SocNephrol; 13:559–75.

Van Gool et al. (1996). T helper-independent activation of human CD8+ cells: the role of CD28 costimulation. Scand J Immunol. 1996; 44:21–9.

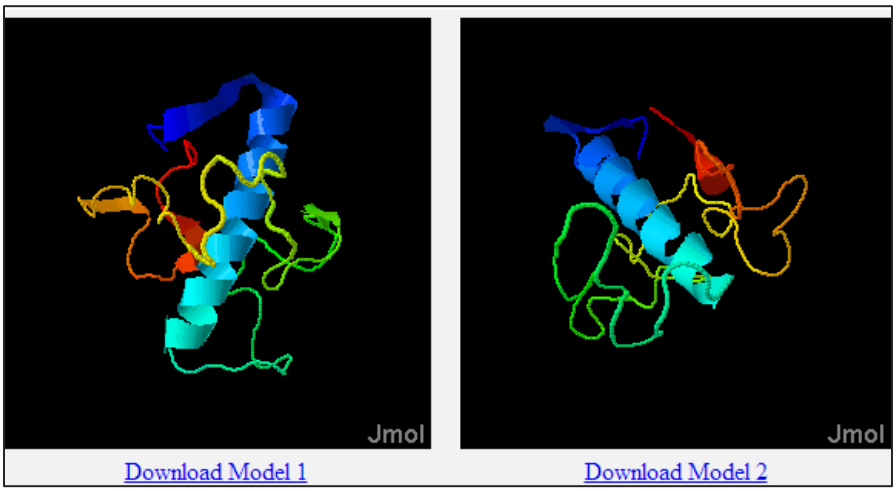
Villegas Bermudez G. (2003). Anticuerpos anti-péptido citrulinado en el diagnóstico de Artritis Reumatoide. Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica) v.38 n.12 San José.

ANEXO. CÁLCULO DE LA ESTRUCTURA DE β-FIBRINA

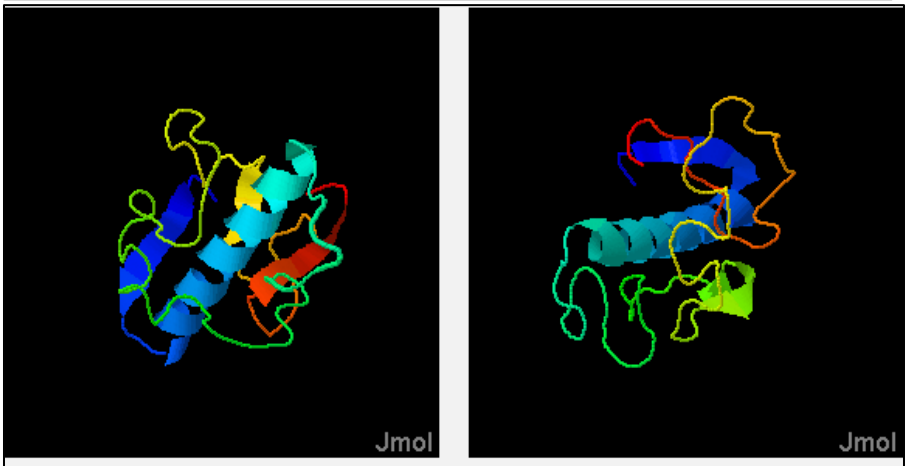
D. Xu, Y. Zhang, Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field. Proteins, 2012, 80, 1715-1735



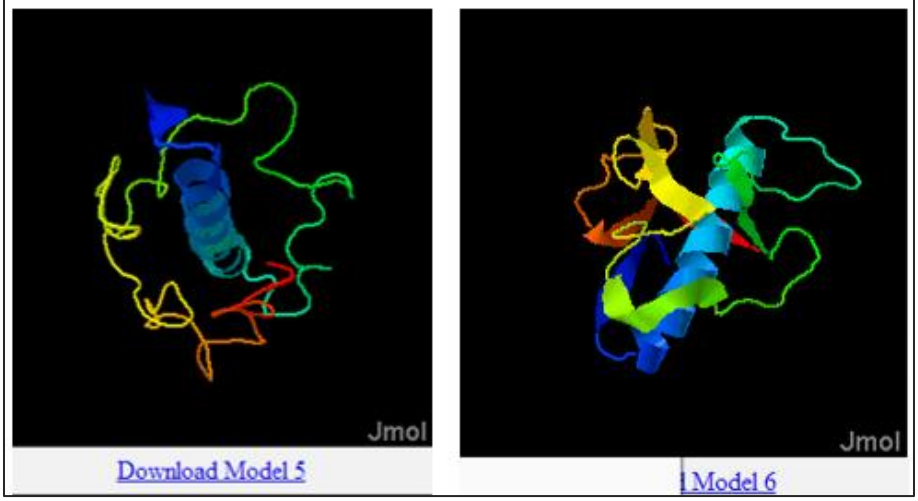
Predicted Tertiary Structure (10 models)



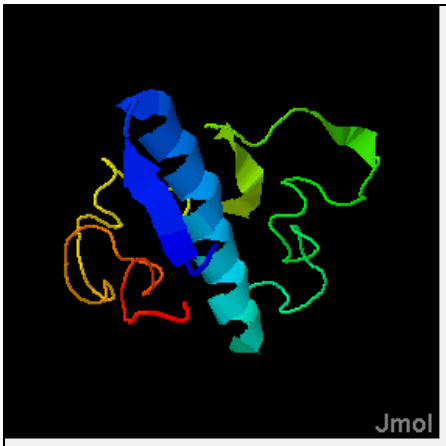
Download Model 1 Download Model 2



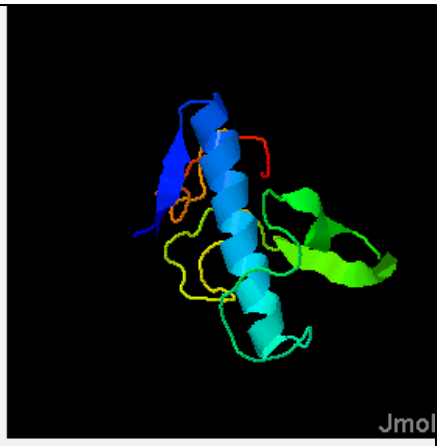
Download Model 3 Download Model 4



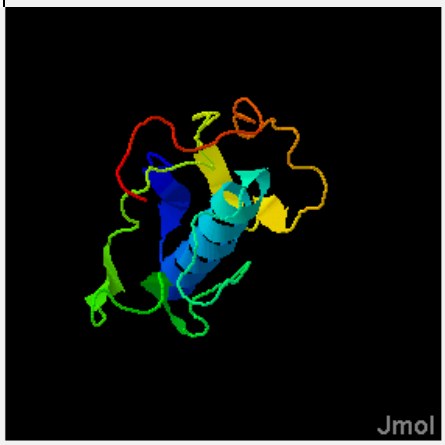
Download Model 5 Model 6



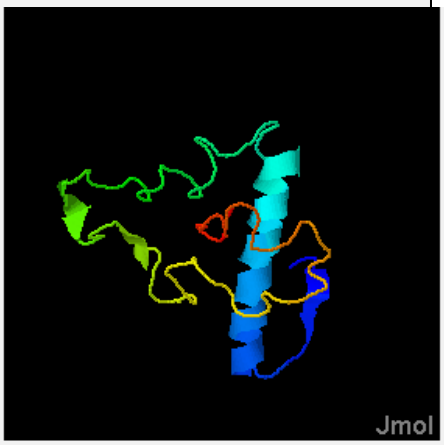
Download Model 7



Download Model 8



Download Model 9



Download Model 10