

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES**  
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS Y BIOMEDICAS  
Instituto de Servicios de Laboratorio y de Diagnóstico en Salud  
SELADIS.



# **PERFIL DE LA RESPUESTA DE AUTOANTICUERPOS EN ARTROPATIAS.**

Postulante:

**Lic. JOVICA DEYNI TORREZ BOTELLO**

**Tesis para optar el grado de Master en  
Ciencias Biológicas y Biomédicas.  
MENCIÓN INMUNOLOGÍA.**

La Paz – Bolivia  
2008

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS  
Instituto de Servicios de Laboratorio y de Diagnóstico en Salud  
SELADIS.



# **PERFIL DE LA RESPUESTA DE AUTOANTICUERPOS EN ARTROPATIAS.**

Postulante:

**Lic. JOVICA DEYNI TORREZ BOTELLO**

Asesores:

**Dr. Roger Carvajal Ph.D.  
Dra. Milet Curkuy**

**Tesis para optar el grado de Master en  
Ciencias Biológicas y Biomédicas.  
MENCIÓN INMUNOLOGÍA.**

La Paz – Bolivia  
2008

## INDICE

RESUMEN.	6
I. INTRODUCCION.	7
II. ANTECEDENTES.	10
Tolerancia Inmunológica	10
Tolerancia de Células T	10
Tolerancia de Células B	12
Autoinmunidad.	13
Factores Genéticos asociados a Autoinmunidad	14
Rol de los Factores Ambientales en Autoinmunidad	15
Vías de señalización y Autoinmunidad	17
Factores de transcripción relacionados con Autoinmunidad	19
Enfermedades Autoinmunes	20
Mecanismos patogénicos en las Enfermedades Autoinmunes	23
Colágeno y Autoinmunidad	25
La respuesta inmune contra colágeno en enfermedades o procesos Autoinmunes.	29
Respuesta Inmune contra colágeno en la Artritis Experimental	38
Participación de la respuesta Inmune contra la Membrana sinovial.	41
Otros mecanismos inmunológicos indicadores de inflamación: Procesos de citrulinización, Factor reumatoide, proteína C reactiva, Velocidad de Eritrosedimentación	43
III. ASPECTOS GENERALES DEL DISEÑO DEL DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.	45
a. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	45
b. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	46
c. JUSTIFICACIÓN.	46
d. HIPOTESIS.	47
e. ESTRATEGIA DE EJECUCION	47

f. OBJETIVOS	48
IV. MATERIAL Y METODOS.	49
a. Diseño de investigación.	49
b. Ejecución de la Ruta crítica	51
c. Estandarización de procedimientos y de obtención de bioreactivos.	52
i. Determinación de anticuerpos Anti-péptido cíclico citrulinado por ELISA.	52
ii. Estandarización de Procedimientos: Determinación de Anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo por prueba de ELISA.	53
Consideraciones teóricas.	53
Obtención y preparación del Colágeno tipo II.	55
Pegado del antígeno.	56
Estandarización del Procedimiento.	58
Preparación del control negativo.	59
iii. Determinación de anticuerpos Anti-membrana Sinovial por Inmunofluorescencia Indirecta.	61
Obtención del tejido.	62
Eliminación de inmunoglobulinas de depósito en tejido sinovial mediante lavados.	62
Determinación de las diluciones óptimas del suero y del conjugado fluoresceinado.	63
Preparación del suero control negativo.	64
Determinación de anticuerpos anti-tejido sinovial: procedimiento.	65
iv. Otros Marcadores.	66
d. Análisis estadístico	66
V. RESULTADOS.	67
i. Determinación de anticuerpos Anti-péptido Cíclico Citrulinado por ELISA indirecto.	67

ii.	Estandarización de procedimientos para la determinación de anticuerpos anti-colágeno tipo II por ELISA indirecto.	69
	Estandarización de Procedimientos.	70
	Determinación de las diluciones óptimas de los reactantes.	70
iii.	Determinación de anticuerpos	
	Anti-colágeno tipo II nativo por ELISA.	75
	Evaluación de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo como método de diagnóstico.	82
iv.	Determinación de anticuerpos contra tejido sinovial por Inmunofluorescencia Indirecta.	83
	Estandarización de la prueba de inmunofluorescencia para la determinación de Anticuerpos Anti-sinovial.	83
	Estandarización del pegado del tejido al soporte de vidrio (portaobjetos).	83
	Determinación de las diluciones adecuadas de suero y de conjugado para determinar la presencia de Anticuerpos anti-sinovial.	86
	Determinación de los niveles de anticuerpos anti-sinovial.	87
	Presencia de Anticuerpos contra otras estructuras del tejido sinovial.	90
v.	Niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo y su relación con datos clínicos.	91
vi.	Correlación entre niveles de anticuerpos contra autoantígenos en artropatías	98
VI.	DISCUSIÓN.	105
VII.	CONCLUSIÓN.	119
VIII.	RECOMENDACIONES.	120
IX.	BIBLIOGRAFIA.	121
X.	ANEXOS	143

**Titulo.                    PERFIL DE LA RESPUESTA DE AUTOANTICUERPOS  
                                  EN ARTROPATIAS.**

**RESUMEN**

Las enfermedades Autoinmunes afectan aproximadamente al 5% de la población y comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades de las que no se conoce suficientemente su etiología; se caracterizan por ser multifactoriales, con fuerte predisposición genética, tener asociación con factores ambientales como infecciones virales y bacterianas y con otros factores que regulan la correcta respuesta del sistema inmune.

Entre estos procesos Autoinmunes destacan las “*enfermedades del colágeno*” por la existencia de procesos exacerbados de fibrosis localizada en los tejidos donde se constituye la lesión siendo la mas frecuente en nuestro medio la Artritis Reumatoide. En estas enfermedades se instala una respuesta autoinmune dirigida contra estructuras que conforman el tejido conectivo, donde la principal proteína y la más abundante es el colágeno. En la Artritis Reumatoide se han reportado respuestas contra el colágeno tipo II, molécula que sería el principal autoantígeno gatillante de la enfermedad; tal hecho ha sido evidenciado en modelos experimentales como la Artritis Inducida por Colágeno (CIA) o por Anticuerpos Anti-colágeno tipo II (AIAC). Sin embargo, aún no está claro el papel de estos anticuerpos en la etiopatogenia y en la evolución de los procesos artríticos. El presente trabajo busca contribuir al conocimiento de este proceso a través de la determinación del perfil de la respuesta de autoanticuerpos en sujetos con artropatía Reumática y en sujetos con artropatías inespecíficas. Para esto se realizó un estudio descriptivo, de corte transversal, en el que se estudiaron tres tipos de poblaciones:

- Sujetos con Artritis Reumatoide diagnosticados bajo criterios clínicos.
- Sujetos con “artralgias inespecíficas” no compatibles con Artritis Reumatoide.
- Sujetos aparentemente normales.

En estos sujetos se determinó los niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo así como anticuerpos anti-CCP (anti-péptido cíclico citrulinado) por el método de ELISA; también se detectó la presencia de anticuerpos anti-sinovial por Inmunofluorescencia Indirecta. Previamente estos métodos fueron estandarizados de acuerdo a procedimientos convencionales.

Se encontró que niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo en los tres grupos estudiados incluyendo los normales, presentan curvas de distribución bimodal, pero los perfiles de dichas curvas son totalmente diferente entre ellos: en los sujetos normales existe un pico de títulos bajos y otro de títulos altos, en los sujetos con artralgias inespecíficas existe un pico de títulos intermedios y otro de títulos altos y en los sujetos con Artritis Reumatoide existe un pico con títulos intermedios y otro de niveles “muy elevados”.

El grupo de sujetos que constituye la curva de los niveles muy elevados de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo en Artritis Reumatoide, esta conformado solo por los individuos que no reciben tratamiento inmunosupresor.

No existe correlación entre estos marcadores con los anticuerpos anti-CCP con los anticuerpos anti-sinovial y con la ingesta de cartílago.

Por tanto, los niveles elevados de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo, parecen constituir un predictor temprano de la instalación y la evolución de la Artritis Reumatoide, en sujetos con artralgias y en la población normal.

## **I. INTRODUCCION.**

Los procesos Autoinmunes fueron descritos por primera vez en 1901 por Paúl Erlich, uno de los fundadores de la Inmunología y premio Nóbel en 1908, propuso su dictamen *Horror Autotoxicus*, el cual determinó que la Autoinmunidad, uno de los aspecto más discutidos en la nueva ciencia de la Inmunología.

El grupo más importante de Enfermedades Autoinmunes están en el campo de la Reumatología y son las mas relevantes las denominadas enfermedades del colágeno: Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Artritis Reumatoide, Esclerodermia y Dermatomiositis. En estas “Colagenopatías”, existen acumulos de infiltración de tejido fibroso responsable de gran parte del daño en órganos del sistema locomotor. Existe otro grupo de enfermedades verdaderas del colágeno; son las que manifiestan trastornos genéticos de esta molécula, deficiencias en su síntesis o actividad anormal de las enzimas involucradas en la síntesis o degradación; se cita entre estas el Síndrome de Ehlers Danlos y el Síndrome de Marfan. (Kivaniemi H. et al, 1997).

En las llamadas “colagenopatías” se ha encontrado la existencia de respuesta autoinmune dirigida contra estructuras que conforman, sobre todo, el tejido conectivo, cuya principal proteína es el colágeno. Si bien el proceso de respuesta inmune humoral contra colágeno se ha descrito con mayor precisión en otros procesos fibrosantes como la Fibrosis Pulmonar Idiopática y la Esclerosis Sistémica, existen evidencias de que este proceso también se produce en la Artritis Reumatoide Humana así como en los modelos de Artritis Experimental (Müller-ladner U. et al, 2005).

En procesos fibrosantes como la Fibrosis Pulmonar Idiopática se produce un patrón en el que el antígeno es el colágeno contra el que se desata una respuesta inmune

celular. No se conoce los factores que inician el proceso de daño a nivel de epitelio alveolar y/o endotelio vascular pero se estiman que son procesos de inflamación, interacción mesénquima-epitelio, apoptosis epitelial, alteraciones endoteliales y alteraciones en la coagulación (Luzina I. et al 2008) estos procesos culminan con el inicio de mecanismos de reparación (proceso alterado) del tejido. Este mecanismo de reparación conduce a la síntesis de diversos factores de crecimiento y citocinas como TGF- $\beta$ , Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) los cuales actúan sobre los miofibroblastos para su diferenciación en fibroblastos y síntesis de más colágeno, lo que incrementa el proceso inflamatorio y de daño al aumentar localmente la cantidad del antígeno, produciéndose, por tanto, un círculo vicioso característico de la fibrosis que es progresiva e irreversible (Carvajal R. et al 1981; Scotton C. et al, 2007). También se ha encontrado asociación de la fibrosis pulmonar con polimorfismos del gen de fibronectina (FN), (Avila J. et al, 1999).

Por su parte la Esclerosis Sistémica es una enfermedad multiorgánica caracterizada por acumulación infiltrativa de tejido conectivo, con gran variabilidad en cuanto al curso de la enfermedad y al pronóstico. (Wigley FM. et al, 1998; Medsger TA. et al 2001; Seibold JR. et al 2001). Se han encontrado diferencias en las características clínicas y serológicas tanto en la Esclerodermia limitada como en la difusa; esto debido a los polimorfismos genéticos basados en la asociación entre los autoanticuerpos contra colágeno y otros componentes del tejido conectivo y las moléculas del MHC clase II (Gilchrist FC, et al, 2001; Johnson RW, et al, 2002). No se conoce el gatillo que desencadena el proceso inflamatorio, pero se estima que es el colágeno tipo I, el componente que induce una respuesta inmune celular con gran producción de citocinas pro-inflamatorias entre ellas el TNF $\alpha$ , el cual está involucrado en la patogénesis de la oclusión vascular y/o en el remodelamiento del tejido conectivo. Esta citocina activa fibroblastos los cuales como respuesta producen más colágeno tipo I (antígeno), incrementando el proceso inflamatorio de forma progresiva e irreversible (Atamas S. et al, 2003).

En la Artritis Reumatoide se ha evidenciado la existencia de respuesta inmune humoral contra el colágeno tipo II, la cual sería responsable de desencadenar el patrón



fibrótico. De esta forma, el colágeno tipo II sería el principal autoantígeno en la Artritis Reumatoide, ya que se encuentra en gran cantidad en cartílago articular. Lo anterior se respalda en la presencia de autoanticuerpos para colágeno tipo II en la Artritis Reumatoide temprana y en la existencia de procesos semejantes a la Artritis Reumatoide en modelos experimentales, como la Artritis Inducida por Colágeno (CIA) o la Artritis Inducida por Anticuerpos Anti-Colágeno tipo II (AIAC). Ratones con CIA han sido una fuente importante para numerosos estudios, varios de ellos usan anticuerpos monoclonales que reconocen estructuras específicas del colágeno tipo II nativo, no reconociendo fragmentos de colágeno tipo II desnaturalizado (Schulte S., et al, 1998). Varios epítopes han sido identificados en la molécula de colágeno tipo II nativo, siendo los mas relevantes el CB11 (residuos 359 – 363) y el CB10 los cuales son reconocidos por varios anticuerpos monoclonales (Schulte S. et al, 1998, Cook A, et al, 2004) y también por sueros de pacientes con Artritis Reumatoide (Burkhardt H, et al, 2002).

Sin embargo, dada la multifactorialidad de la Artritis Reumatoide y debido a la gran variabilidad de eventos a lo largo del curso de la enfermedad y en el pronóstico, no en todos los casos se desencadena el proceso fibrótico o de daño en el cartílago articular. En un porcentaje de casos, pacientes con Artritis Reumatoide temprana con anticuerpos anti-colágeno tipo II, tienen un fenotipo único donde la inflamación temprana es mediada por complejos inmunes en los que interviene el cartílago (Mullazehi M, et al 2007). No obstante, el significado de los anticuerpos anti-colágeno tipo II en la Artritis Reumatoide Humana aún no esta aclarado. Por un lado su participación en la etiopatogénesis no ha sido elucidada el hecho de que no todos los sujetos con Artritis Reumatoide presentan estos anticuerpos en suero y existen sujetos sin daño articular evidente que tienen títulos significativos. Por otro lado, la participación de estos anticuerpos como método de diagnóstico de la enfermedad tampoco ha sido esclarecida.

Por otra parte, se ha encontrado que en la Artritis Reumatoide también están presentes autoanticuerpos dirigidos contra estructuras que se forman por la acción de

enzimas moduladas hormonalmente; tal es el caso de los *Péptidos Cíclicos Citrulinizados* presentes en tejido articular como epítopes moleculares del colágeno y de la membrana sinovial articular (Vossenaar E. et al, 2003; Koivula M. et al, 2007). Se asume que estos anticuerpos son marcadores de Artritis Reumatoide y permiten excluir a sujetos con otro tipo de artropatías (Van Gaalen F. et al. 2004).

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se pretende determinar el perfil de la respuesta de estos autoanticuerpos (anti-colágeno tipo II nativo, anti-membrana sinovial y anti-péptidos cíclicos citrulinados) en sujetos con Artritis Reumática y en sujetos con artropatías inespecíficas.

## II. ANTECEDENTES.

### Tolerancia Inmunológica.

La Tolerancia es un proceso que elimina o neutraliza células autoreactivas tanto en la respuesta de las células T como por células B; la ruptura de la tolerancia lleva al desarrollo de la Autoinmunidad. Este proceso se desencadena a nivel de los órganos encargados de la génesis y maduración de dichas células (tolerancia central) o en los órganos periféricos en los que se desarrolla la respuesta y las reacciones inmunológicas (tolerancia periférica).

### *Tolerancia de Células T.*

En la *Tolerancia Central* el principal mecanismo es la delección de células T autoreactivas en el Timo. Las células T inmaduras migran de la Médula Ósea al Timo, donde interaccionan con péptidos derivados de proteínas endógenas unidas a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) (Ohashi PS. et al, 1996; Delves PJ. et al, 2000). La interacción del receptor de la célula T (TCR) con el antígeno libera un gradiente de señales intracelulares cuya amplitud e intensidad depende de la afinidad (Sebzda E. et al 1999; Mariathasan S. et al 2001). Las células T con receptores de muy baja afinidad para el complejo péptido-CMH, no reciben

señales y mueren en el timo; otras células T con receptores de alta afinidad para el complejo péptido-CMH sufren apoptosis proceso llamado selección negativa. Las células T con receptores de afinidad intermedia para este complejo maduran en el timo y migran a la periferie, proceso denominado selección positiva (Yagi J. et al, 1990; Pircher H. et al 1991). Alteraciones durante la selección del repertorio de las Células T en el Timo durante la presentación de autoantígenos unidos a ciertas moléculas del CMH susceptibles a autoinmunidad, han sido asociadas a la aparición de Autoinmunidad (Watanabe Y. et al, 1993; Thomas-Vaslin V. et al, 1997; Geng L. et al, 1998; Lühder F. et al, 1998; Ridgway WM. et al, 1999).

La *Tolerancia periférica* es el mecanismo de tolerancia de células T para antígenos de tejidos específicos que no son presentados en el timo. Entre estos tenemos la ignorancia inmunológica, la falla en la deleción de células, la anergia, la inhibición-supresión y la desviación.

En la *ignorancia inmunológica* las células T nativas no reaccionan contra un antígeno extraño, no obstante que este es reconocido; se han planteado diversos mecanismos (Mackay I, et al 2001), esto fue demostrado en ratones genéticamente modificados que expresan un TCR que reconoce partículas de péptidos virales los cuales fueron apareados con otra cepa transgénica que expresa péptidos virales en la superficie de las células de los islotes pancreáticos, encontrándose que la descendencia no desarrolla diabetes (Ohashi PS. et al 1991; Oldstone MBA. et al 1991); por lo tanto, las células T ignoraban sus células blanco. Los mecanismos se asocian a los bajos niveles de antígeno, a los antígenos separados de los linfocitos T por barreras físicas (ejemplo la barrera hematoencefálica) o a la ausencia de moléculas co-estimuladoras para inducir una respuesta (Janeway C, 2001).

EL proceso de *deleción de las células T* se produce por la pérdida de factores de crecimiento, o por apoptosis mediada por Fas (CD95) y su ligando (CD95L). Alteraciones en Fas son importantes en la patogénesis autoinmune (Krammer PH. 2000; Sabelko-Downes KA. et al, 2000), por que permite la sobrevivencia y ocasional activación de Células T autoreactivas (Ohashi PS. et al, 1991; Banchereau J. et al, 1998; den Boer A. et al, 2001; Garza KM. et al, 2000; Hawiger D. et al, 2001).

Pacientes con defectos en Fas desarrollan una severa enfermedad linfoproliferativa (Fisher GH. et al, 1995; Rieux-Laucat F. et al, 1995; Krammer PH. et al, 2000).

El mecanismo de *anergia* se produce por la falta de activación de las células T por ausencia de IL-2 (Falb D. et al, 1996) y la síntesis de IL-10, la cual suprime la activación de células T (Buer J. et al, 1998; Carbone FR. et al, 1998; Garza KM. et al, 2000; Heath WR. et al, 2001).

El proceso de inhibición se da por la expresión de la llamada proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxico o CTLA-4 (CD152), este es un segundo receptor para B7, expresado en la superficie de las células T que regulan la respuesta inmune, porque atenúa la respuesta de la célula T por activación de las célula T reguladoras (Walunas TL. et al, 1994; Krummel MF. et al 1996; Walunas TL. et al, 1996; Chambers CA, et al, 1999), facilitando la apoptosis (Gribben JG. et al, 1995) y suprimiendo la secreción de citocinas TH1 y TH2 (Krummel MF. et al, 1996; Walunas et al, 1996; Alegre ML. et al, 1998). El bloqueo de CD152 acelera la progresión de diabetes autoinmune en modelo experimental (Lühder F. et al, 2000).

El mecanismo de *supresión y desviación* de la respuesta de las células T esta modulado por las Células T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (Zhang ZX, et al, 2000), sintetizando IL-10 o Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que suprimen la activación de linfocitos T, o a través de la síntesis de las citocinas que desencadena un equilibrio en la respuesta tipo TH1 (IFN  $\gamma$ , TNF  $\beta$  e IL-2) o TH2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13) (Delves PJ, et al 2000), estas ultimas células reguladoras prevendrían el proceso de Autoinmunidad (Shevach EM. et al, 2000).

### ***Tolerancia de Células B.***

Existen varios mecanismos para desarrollar tolerancia en el repertorio de los linfocitos B, entre estos tenemos la deleción clonal de células B inmaduras a nivel de médula ósea (Nemazee JC. et al, 1989), la deleción de Células B autoreactivas en bazo y nódulo linfático (Rathmell JC. et al, 1996), la inactivación funcional (anergia) (Goodnow CC. et al, 1988) y la falla en el proceso denominado "receptor editing". Este mecanismo cambian la especificidad de los receptores de las células B (Nemazee D.

et al, 2000), formándose anticuerpos contra estructuras de organismo siendo los responsables directos de lesión ocasionando la ruptura de la tolerancia y por lo tanto muchas Enfermedades Autoinmunes ya que gran parte de estos son consideradas antígeno específicas (Marrack P. et al, 2001).

### **Autoinmunidad.**

Los procesos Autoinmunes fueron descritos por primera vez en 1901. Paúl Erlich, uno de los fundadores de la inmunología y premio Nóbel (1908), propuso su dictamen *Horror Autotoxicus*, que había desarrollado a partir de su estudio sobre isoanticuerpos en cabras, por lo que hizo que la autoinmunidad fuera el aspecto más discutido en la nueva ciencia de la inmunología. Proponía que los efectos patógenos de los autoanticuerpos eran bloqueados por otros autoanticuerpos correspondientes (lo que hoy se llama anticuerpos anti-idiotipos). La evolución de ésta teoría de autoinmunidad llevó a Burnet McFarlane a desarrollar la idea de la tolerancia inmunológica y del yo inmunológico. Mantenía que una de las principales funciones del sistema inmunitario es diferenciar entre lo propio y lo ajeno, y añadió que cuando esta distinción se rompe el resultado es la autoinmunidad.

Las Enfermedades Autoinmunes constituyen un problema de salud relevante ya que, además de su alta prevalencia afectan considerablemente la calidad de vida de las personas que las padecen por la discapacidad funcional progresiva que acelera la mortalidad de estas personas.

Todas las formas de expresión de las patologías reumáticas comparten síntomas comunes como dolor severo de articulaciones y pérdida de de la movilidad de estas como primera manifestación de la falla de origen Autoinmune, tal es el caso de la Artritis Reumatoide, Osteoartritis, Síndrome de Sjögren, Lupus Eritematoso Sistémico u otros tipos de enfermedades del tejido conectivo como la Esclerodermia.

El desarrollo de procesos Autoinmunes es muy complejo ya que involucra muchos eventos que afectan diversos tejidos y células del organismo. Existen muchos factores relacionados con los procesos Autoinmunes, los cuales pueden incrementar la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes por la reactividad de las células del sistema inmune, provocando una respuesta contra un determinado antígeno, que se constituye en un blanco del ataque inmune.

### **Factores Genéticos asociados a Autoinmunidad.**

Muchos estudios epidemiológicos han demostrado que diversos factores genéticos son determinantes en la susceptibilidad a Enfermedades Autoinmunes (Gregersen PK. et al, 1997). Los factores genéticos influyen en la predisposición y en el curso de la enfermedad (Andre I. et al, 1996, Wakeland EK. et al, 2001). Las Enfermedades Autoinmunes son multigénicas, la expresión de algunos genes confiere mayor susceptibilidad que otros; entre estos destacan, los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) los cuales tienen una fuerte asociación en especial los genes del CMH-clase II (Klein J. et al, 2000), con la expresión de fenómenos autoinmunes. Por otro lado, algunos alelos de CMH confieren protección (Becker KG. 1999; Encinas JA. et al, 2000) contra procesos autoinmunes. Estudios en ratones genéticamente modificados, se evidenció el papel de otros genes como aquellos que codifican citocinas los cuales tienen un rol importante en el desarrollo de procesos Autoinmunes (Falcone M. et al, 1999; Gorelik L. et al, 2002; O'Shea JJ. et al, 2002). Por medio de la ingeniería genética en modelos experimentales (deleción o sobreexpresión de genes) se identificaron aproximadamente 25 genes que pueden contribuir a Enfermedades Autoinmunes, estos genes codifican citocinas (por ejemplo TNF  $\alpha$ , IL-2, IFN  $\gamma$ , IL-19, IL-20, IL-22, IL-23, IL-27 (O'Shea JJ. et al, 2002; Deepak Y. et al, 2003), co-receptores, moléculas co-estimuladoras (CTLA-4), moléculas involucradas en la vía de la apoptosis, o genes del Sistema de Complemento (deficiencias de C2 y C4) (Khare SD. et al, 1999; Taneja V. et al, 1999).

En el caso de los humanos es conocida la predisposición familiar y la asociación de enfermedades, como la Espondilitis Anquilosante, con alelos específicos del CMH B7 (Abbas A. 2002).

### **Rol de los Factores Ambientales en Autoinmunidad.**

Varios mecanismos del medio ambiente pueden ser los responsables de la ruptura de la tolerancia y desencadenar procesos autoinmunes, entre estos tenemos a los agentes infecciosos que pueden activar potencialmente a las células T autoreactivas, tal es el caso de la Esclerosis Múltiple y de la Diabetes Mellitus Tipo I (Kurtzke JF. et al, 1994). El mecanismo que puede conducir al desarrollo de autoinmunidad es el mimetismo molecular donde el microorganismo patógeno expresa antígenos que son similares a los autoantígenos del huésped, así la célula T activada por el microorganismo patógeno puede reaccionar en forma cruzada con los tejidos propios e iniciar una Enfermedad Autoinmune órgano-específica (Damian RT. et al, 1964; Oldstone MBA. et al, 1987; Oldstone MBA. et al, 1991; Ohashi PS. et al, 1991). En esta dirección, se han buscado moléculas en agentes infecciosos con epítopes reconocidos por linfocitos B y que se encuentren también en moléculas propias y aun más importante, moléculas que contienen secuencias con los *motivos* requeridos para poder ser presentados por determinados alelos de antígenos de histocompatibilidad y que mimeticen péptidos propios. Epítopes con estas características se han encontrado en moléculas altamente conservadas en la filogenia, de todas ellas las más analizadas han sido las *proteínas de estrés o de choque térmico* (HSP *heat shock proteins*). Las proteínas de estrés, son producidas por todas las células procariontas y eucariotas. Existen varias familias de estas proteínas cuya producción se incrementa rápidamente, en situaciones de estrés o estímulos adversos para la célula (incremento de la temperatura, desecación, falta de glucosa en el medio, falta de otros nutrientes, radiación ultravioleta, radiaciones ionizantes, estímulos inductores de apoptosis en general). Las proteínas de estrés tienen alta similitud siendo de distintos orígenes. La denominada HSP 70 de la E. coli y del hombre tienen un 50% de homología. Por otra parte dichas proteínas juegan un papel fundamental en el correcto plegamiento de otras proteínas a las que acompañan temporalmente para translocarlas de un

compartimiento de la célula a otro. (Craig EA, 1993; Fink AL. 1999). En cualquier caso, una respuesta inmunológica montada en principio contra epítopes o péptidos de la proteína de estrés del microorganismo podría reaccionar cruzadamente con proteínas de estrés propias y colaborar a que se establezca por un mecanismo de “*spreading*” (diseminación) de respuesta contra antígenos propios, preferentemente contra la proteínas que acompañadas por las proteínas de estrés forman complejos moleculares. Anticuerpos contra varias proteínas de estrés se han encontrado en diversas Enfermedades Autoinmunes como Diabetes tipo I, Enfermedad de Crohn, Artritis Reumatoide y Lupus Eritematoso. Intervienen también en el desarrollo de Enfermedades Autoinmunes Experimentales, como en la Artritis por Adyuvante (Elias D. et al, 1990; Albani S, et al 1995; Birk OS. et al, 1996; Prakken AB, et al 1996; Wendling U. et al, 2000; Raz I. et al, 2001; Prakken BJ. et al 2004; van Eden W. et al 2005), y posiblemente en aquellas que se consiguen por la inmunización de animales con extractos proteicos emulsionados con adyuvante completo de Freud (Satpute S. et al, 2007)

El daño tisular generado durante los procesos infecciosos puede provocar la liberación de autoantígenos secuestrados o la formación de neoantígenos. (Miller SD. et al, 1997; Horwitz MS. et al, 1998). Asimismo, la activación policlonal de linfocitos T por endotoxinas o por superantígenos (Perron H. et al, 1997; Horwitz M. et al, 1998; Abbas A. 2002), la inducción de citocinas pro-inflamatorias y moléculas co-estimuladoras por diferentes microorganismos (Kamradt T. et al, 1991; Klinman DM. et al, 1996; Tough DF. et al, 1997; Cella M. et al, 1999; Infante-Duarte C. et al, 2000), han sido reportados como mecanismos causantes de autoinmunidad tanto en modelos experimentales como en procesos involucrados en la patogénesis autoinmune humana.

### **Sustancias químicas.**

Ciertas drogas como la hidralazina y la procainamida (Parslow T. 2001), pueden inducir la aparición de LES y de determinados anticuerpos antinucleares. Otras, como la alfa-metildopa, pueden inducir Anemia Hemolítica Autoinmune por anticuerpos de la clase IgG. El halotano y ácido tienílico inducen la formación de anticuerpos contra el



citocromo P450 y la consecuente hepatopatía. En la actualidad no se conoce con certeza el mecanismo de acción de dichas sustancias en el desarrollo del fenómeno, pero una posibilidad es que modifiquen determinadas proteínas creando neoantígenos y que estos intervengan en la ruptura de la tolerancia para los antígenos propios (Abbas A. 2002).

### **Factores hormonales.**

Las hormonas sexuales femeninas intervienen, de forma aún no aclarada, favoreciendo la aparición de Enfermedades Autoinmunes. De hecho, las Enfermedades Autoinmunes son en general mucho más frecuentes en mujeres que en varones. La relación mujer varón va desde 4:1 para la Diabetes tipo I y para la Artritis Reumatoide, hasta 50:1 para la Tiroiditis de Hashimoto, Cirrosis Biliar Primaria y Hepatitis Autoinmune clásica, todos estos procesos pueden estar relacionados con los estrógenos. (Cutolo M. et al, 2005).

### **Vías de señalización y Autoinmunidad.**

Varios componentes de las vías de señalización, así como las quinasas, las fosfatasa, las moléculas adaptadoras y las moléculas “scaffolds”, son esenciales para coordinar señales extracelulares con la función celular. Estudios diversos en ratones *Knock out* para receptores Tirocin Kinasa Tyr, Axl y Mer demostraron que estos receptores regulan negativamente la activación de la Célula Presentadora de Antígeno (CPA) y que en ausencia de estos, las CPA son activadas permanentemente causando procesos de autoinmunidad (Lu Q. et al, 2001). Asimismo, alteraciones en la actividad de las fosfatasa como SRC-homologo 2 (SH2) – dominio que contiene proteína tirosina fosfatasa 1 (SHIP 1), dominio SH2 que contiene inositol 5 fosfatasa (SHIP 2) y en CD 45 han sido asociado a autoinmunidad (Tsui FWL. et al, 1994; Helgason CD. et al, 1998; Jacobsen M. et al, 2000; Majeti R. et al, 2000; Lynch KP. et al, 2001).

La fosfatidil inositol 3 kinasa (PI3K) es una molécula clave en el metabolismo de los fosfolípidos; regula muchos eventos celulares incluyendo el crecimiento celular, la proliferación, los cambios del citoesqueleto y la sobrevivencia (Chan TO. et al, 1999;

Balomenos D. et al, 2000; Chui D. et al, 2001; Demetriou M. et al, 2001; Santiago-Raber ML. et al, 2001). Ratones transgénicos que sobreexpresan PI3K, p65<sup>PI3K</sup>, bajo el control de un promotor proximal Lck (Borlado LR. et al, 2000), resultan en la activación de efectores incluyendo protein Kinasa B (PKB) Akt y Rac (Jimenez C. et al, 1998), estos ratones desarrollan esplenomegalia y linfadenopatias con una predominante expansión de células T CD4<sup>+</sup>; estas células tienen una susceptibilidad reducida a la apoptosis mediada por Fas, lo que permite desarrollar procesos de inflamación y Enfermedad renal autoinmune (Borlado LR. et al, 2000). Alteraciones en otras moléculas de la vía PI3K como PTEN (phosphatase and tensin homologue) y PKB (Protein Kinasa B), han mostrado alteración en la homeostasis y predisposición a autoinmunidad. PTEN es una fosfatasa que regula negativamente el nivel de fosfatidilinositol 3, 4, 5 trifosfato. Ratones Knock out PTEN <sup>-/-</sup> son inviables, pero ratones heterocigotos para PTEN incrementan los niveles de PKB. PKB es una treonina serina kinasa expresada ubiquitadamente, que promueve la sobrevivencia celular. Notablemente, incrementos de la actividad de PI3K y PKB en células T es suficiente para alterar la homeostasis de los linfocitos, con hipergammaglobulinemia y signos de autoinmunidad (Borlado LR. et al, 2000; Parsons MJ. et al, 2001), vinculada a la alteración en la apoptosis mediada por Fas.

La apoptosis mediada por Fas es importante en la delección periférica de células autoreactivas (Russell JH. et al, 1993; Singer GG. et al, 1994; Bonfoco E. et al, 1998). El significado de la apoptosis mediada por Fas en autoinmunidad se ha identificado en ratones con mutaciones en *Fas* o *FasL* conocidos como *lpr* y *gld* (Cohen PL. et al, 1991; Nagata S. et al, 1995) los cuales desarrollan artritis y linfoma. Una enfermedad similar ha sido identificada en pacientes con Síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS–Síndrome de Canale Smith) (Fisher GH. et al, 1995; Rieux-Laucat F. et al, 1995), esta es una enfermedad de ataque temprano en la infancia; los individuos desarrollan esplenomegalia, linfadenopatía, hipergammaglobulinemia y expansión de una población inusual de CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>TCR αβ<sup>+</sup> (Sneller MC. et al, 1997).

El *Cbl* es un proto-oncogen que induce linfomas de células B y ocasionalmente tumores mieloides (Thien CBF. et al, 2001). Está involucrado en la selección positiva

de los linfocitos CD4<sup>+</sup>; Cbl-b es un miembro de la familia de las Cbl, actúa como regulador en la activación de las células T a través de CD28, reduciendo el número de TCRs (Viola A. et al, 1996). Sin embargo la inactivación condicional de Cbl y Cbl-b en las células T resulta en una arteritis autoinmune severa. Los miembros de la familia de las Cbl (Casitas B-lineage lymphoma) pueden regular negativamente la señalización del TCR (Naramura M. et al, 1998; Krawczyk C. et al, 2000).

### **Factores de Transcripción relacionados con Autoinmunidad.**

Se ha asociado con autoinmunidad la existencia de mutaciones de dos factores de transcripción: AIRE (Regulador Autoinmune) y Foxp3.

El gen AIRE está compuesto por 14 exones que codifican para una proteína de 552 aminoácidos; contiene numerosos *motivos*, lo que sugiere la existencia de procesos de modificación post-transcripcional incluyendo dedos de Zinc-PHD (Dominio homólogo a "Plekstrin"), una señal de localización nuclear y un dominio SAND (Factor de Transcripción que se une al DNA). Mutaciones de AIRE, donde existe pérdida de su función, se han asociado a poliendocrinopatía autoinmune (APECED). Esta es la primera enfermedad autoinmune en humanos asociada directamente con mutaciones de un factor de transcripción (Ramsdell F, et al 2003) ya que AIRE controla la selección negativa de timocitos autoreactivos (Liston A. et al, 2003).

En la familia de factores de transcripción se ha identificado también el gen *Foxp3* como regulador importante de la homeostasis de los linfocitos (Brunkow ME. et al, 2001). La mayor expresión de este gen está en las células TH Reguladoras (Ramsdell F. et al 2003); se han detectado genes ligados al cromosoma X en ratones *scurfy*; mutaciones de este gen son letales en homocigotos machos, conduciendo a una activación de células T CD4<sup>+</sup>, que incrementan los niveles de citocinas pro-inflamatorias e infiltración multiorgánica. Mutaciones de Foxp3 están correlacionadas con una enfermedad fatal: IPEX (Desregulación Inmune, Poliendocrinopatía, Enteropatía y Síndrome X) (Bennett CL. et al, 2001; Wildin RS. et al, 2001); esta es una alteración caracterizada por Diabetes Mellitus insulino-dependiente, infecciones, trombocitopenia y otros fallos en diversos órganos.

## **Enfermedades Autoinmunes.**

Las enfermedades Autoinmunes se clasifican clásicamente en: sistémicas y órgano específicas. Entre las primeras se incluyen las que afectan a gran número de órganos y se asocian a menudo con hiperreactividad de linfocitos B que genera un número amplio y variado de autoanticuerpos. En este grupo destacan: Lupus Eritematoso Sistémico (LES), Artritis Reumatoide (AR), Esclerodermia, Dermatomiositis y Polimiositis. De todas ellas la verdaderamente sistémica y que sin duda presenta más alteraciones inmunológicas es el LES. Además, la existencia de diversas cepas de ratones (NZBxNZW, MRL lpr/lpr) que, de forma espontánea, presentan un cuadro clínico y hallazgos inmunológicos muy similares a los del lupus humano, ha permitido conocer más a fondo diversos aspectos inmunológicos y genéticos de dicha enfermedad (Greenstein BD. et al, 1993; Ryan R, et al, 2000).

En las Enfermedades Autoinmunes órgano-específicas, como la Miastenia Gravis, el Pénfigo o la Tiroiditis de Hashimoto, los autoanticuerpos se dirigen específicamente contra un órgano o un tipo celular concreto de un órgano determinado.

Existe un grupo de Enfermedades Autoinmunes difícilmente incluidas en las dos anteriores clasificaciones, por compartir características de ambos grupos, esto es, afectan un solo órgano (preferentemente), pero tienen autoanticuerpos contra estructuras antigénicas diversas, sobre todo nucleares. Entre ellas destacan: la Cirrosis Biliar Primaria, la Hepatitis Autoinmune, y el Síndrome de Sjögren. (Tabla 1).

**Tabla 1. Ejemplo de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas y órgano-específicas con sus autoantígenos blanco conocidos (Marrack P. et al, 2001).**

Enfermedad	Órgano	Ejemplo de autoantígeno conocido	Mecanismo de daño	Prevalencia %
<b>Enfermedades Autoinmunes Órgano específica</b>				
Tiroiditis	Tiroides	Tiroglobulina, peroxidasa tiroide	Células T/anticuerpos.	1 – 2
Gastritis	Estómago	H+/K+ATPasa, factor intrínseco	Células T/anticuerpos	1 - 2
Enfermedad Celiaca	Intestino delgado	Transglutaminasa	Células T/anticuerpos	0.2 – 1.1
Enfermedad de Graves	Tiroides.	Receptor de la hormona estimuladora de tiroides (TSH)	anticuerpos	0.2 – 1.1
Vitíligo.	Melanocitos.	Tirosinasa, proteína liberadora de tirosinasa 2.	Células T/anticuerpos	0.4
Diabetes tipo I.	Células β del páncreas	Insulina, Acido glutámico descarboxilasa.	Células T	0.2 – 0.4
Esclerosis Múltiple.	Cerebro, medula espinal.	Proteína mielínica básica,	Células T	0.01 – 0.15
Pénfigo.	Piel	Desmogleina 1.	Anticuerpos	< 0.01
Hepatitis Autoinmune.	Hígado	Antígenos del hepatocito (citocromo p 450)	Células T/anticuerpos	< 0.01
Miastemia Gravis	Músculo	Receptor de acetilcolina.	Anticuerpos	< 0.01
Cirrosis Biliar Primaria	Conductos Biliares hepáticos.	Complejo 2 oxoacido dehidrogenasa	Células T/anticuerpos	< 0.01
<b>Enfermedades Autoinmunes Sistémicas</b>				
Artritis Reumatoide.	Articulaciones, pulmones, corazón	IgG, filagrina, fibrina, colágeno, péptidos citrulinados, chaperoninas.	Células T en articulación anticuerpos.	0.8
Lupus Eritematoso sistémico.	Piel, articulaciones, riñones, cerebro, pulmones, corazón y otros.	Antígenos nucleares (DNA, histonas, ribonucleoproteínas)	Anticuerpos.	0.1
Polimiositis/dermatomiositis	Músculo esquelético, pulmones, corazón, articulaciones y otros.	Antígenos del músculo, aminoacil RNAi sintetasa, otros antígenos nucleares.	Células T/anticuerpos	<0.01
Esclerodermia	Piel.	Anti-DNA topoisomerasa I (Scl-70), anti-centrómero, anti-fibrilina 1, anti-fibroblastos, anti-células endoteliales.	Células T.	
Fibrosis Pulmonar Ideopática	Pulmones.	Colágeno	Células T.	

Una característica de las Enfermedades Autoinmunes sistémicas, es la presencia de autoanticuerpos frente a antígenos de localización intracelular y no órgano ni especie específicos. Son los denominados anticuerpos antinucleares. El núcleo, la matriz nuclear y el nucleolo, son los compartimentos en que dichos antígenos suelen estar localizados, aunque con la misma denominación de antinucleares se definen con frecuencia a algunos que reconocen antígenos de localización citoplasmática como los RNAi. Los antígenos diana suelen ser moléculas muy conservadas a lo largo de la evolución, como el DNA, las histonas y ciertas enzimas intranucleares.

Algunos de los anticuerpos antinucleares (ANA), se han asociado específicamente a una determinada enfermedad, (incluso a la prevalencia de determinados signos o síntomas) y se utilizan como marcadores para su diagnóstico. Esto ocurre con los anticuerpos anti-DNA nativo y anti-Sm en el LES, los anti-Scl-70 en la Esclerodermia difusa, los anti-centrómero en el Síndrome de CREST (calcinosis, Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasias), anti-sintetasas de RNA de transferencia en la dermatomiositis-polimiositis. Otros autoanticuerpos se encuentran en diversas entidades como las anti-histonas en el LES y en el Lupus Inducido por drogas, el anti-U1 RNP en el Lupus Eritematoso Sistémico, en la Enfermedad Mixta del Tejido Conjuntivo, y algunos casos de Esclerodermia, anti-La y anti-Ro en LES y en el Síndrome de Sjögren y otros muchos de menor significación. Aún no se ha esclarecido los mecanismos por los cuales estos anticuerpos pueden a nivel intracelular intervenir en la patogénesis de estos procesos; solo la asociación entre su presencia y la enfermedad y su perfil signo-sintomatológico se encuentra bien definida. En la Artritis Reumatoide no se ha encontrado respuesta inmune específica contra un determinado antígeno de la articulación aunque algunos estudios indican que el proceso de citrulinización se da en estructuras de la articulación como el colágeno tipo II (Koivula M. et al, 2007); sin embargo, se ha asociado con autoanticuerpos contra antígenos no articulares como IgG, filagrina, fibrina, chaperoninas (Parslow T. 2001) y proteínas citrulinizadas aunque estas pueden estar presentes en otros procesos inflamatorios (Makrygiannakis D. et al, 2006).

En las enfermedades órgano-específicas, los autoanticuerpos o son especie específicos o reaccionan con más alta afinidad con antígenos de la propia especie. Además, en las Enfermedades Autoinmunes órgano-específicas solo se afecta el órgano diana, mientras que en las sistémicas, la repercusión del fenómeno autoinmune, alcanza diversas estructuras del organismo. Desde el punto de vista de la instauración de la respuesta autoinmune (y sin descartar alteraciones de la regulación inmunológica, comunes a ambos tipos de Enfermedades Autoinmunes), todo hace pensar que en las enfermedades órgano-específicas existirían alteraciones cuantitativas o cualitativas relacionadas con alguno o algunos antígenos del órgano diana, mientras que en las sistémicas el factor más importante sería el fracaso de la

regulación inmunológica, con una hiperactivación policlonal aunque restringida de linfocitos B.

### **Mecanismos patogénicos en las Enfermedades Autoinmunes**

Los mecanismos inmunológicos de daño tisular en las Enfermedades Autoinmunes son de los mismos tipos que los que operan en las reacciones inmunológicas denominadas de hipersensibilidad.

Cuando la respuesta autoinmune va dirigida contra antígenos presentes en las membranas basales como en el caso del Síndrome de Goodpasture, la activación del complemento *in situ* conduce al daño celular y a la liberación de mediadores que concentran granulocitos en la zona, los cuales liberan localmente enzimas lisosomales que conducen al daño de la membrana. En estos casos estamos en presencia de un proceso de hipersensibilidad tipo II. En algunos casos los autoanticuerpos van dirigidos contra receptores hormonales y pueden actuar como activadores por ejemplo el hipertiroidismo de Graves. En otros, los autoanticuerpos no activan sino que bloquean los receptores y conducen a una situación de hipofunción, esta es la situación en un tipo de diabetes denominada insulino resistente, en la que anticuerpos contra el receptor de la insulina, interfieren con la acción de dicha hormona. En la Miastenia Gravis, los autoanticuerpos contra el receptor de acetilcolina, no solo bloquean estos receptores en la placa neuromuscular sino que facilitan la internalización y degradación de dichos receptores. En todos los casos descritos y por los mecanismos expuestos, los autoanticuerpos son patogénicos.

La adjudicación de responsabilidad patogénica en los casos de Enfermedades Autoinmunes no órgano específico es más incierto. En el Lupus Eritematoso Sistémico, los anticuerpos anti-DNAs (de doble hebra) o nativo, median la formación de complejos DNA-anti-DNA circulantes, los cuales se depositan preferentemente en riñones y piel en donde activan complemento. Los productos liberados durante la activación del complemento atraen y activan células fagocíticas a la zona. Dichas células vierten localmente sus enzimas lisosomales y determinadas quimiocinas, por lo

que son las verdaderas efectoras del daño local. En estos casos se refiere como hipersensibilidad tipo III (Coombs y Gel, 1975).

Para otros muchos autoanticuerpos muy frecuentes y variados en el Lupus Eritematoso Sistémico no se ha podido demostrar un papel claro en la patogenia. Solamente los anticuerpos anti-Ro y anti-La en los casos de lupus neonatal, se han demostrado patogénicos, produciendo en algunos casos bloqueo aurículo-ventricular y lesiones dermatológicas denominadas eritema anular. El mecanismo de acción no queda claro, pero su patogenicidad sí, ya que las lesiones guardan correlación con la presencia de tales autoanticuerpos en la madre, que los transfiere al hijo a través de la placenta. Las lesiones del niño remiten cuando el catabolismo de la IgG (y por tanto los autoanticuerpos transferidos de la madre) lleva a su desaparición.

Mientras que la patogenicidad de los autoanticuerpos es, en general, fácilmente demostrable, la de los linfocitos T no lo es. La complejidad del sistema que reconoce el linfocito T (péptidos en el contexto de antígenos de histocompatibilidad), constituye un sistema mucho más complejo que el de antígenos y anticuerpos, para analizar *in vitro*. Por otra parte el análisis *in vivo* por transferencia pasiva solo es posible en modelos experimentales, de modo que es a través de dichos modelos que conocemos algunos datos. En este sentido, se ha podido demostrar que linfocitos T obtenidos de animales con Enfermedades Autoinmunes, ya sea desarrollada de una forma espontánea como en el caso de la Diabetes tipo I en los ratones NOD, o bien inducida mediante la administración de antígenos o péptidos de dichos antígenos, como en la encefalomiелitis autoinmune experimental, son capaces de transferir pasivamente a animales de la misma cepa la enfermedad correspondiente (Ravinovich G, 2004).

Los linfocitos T pueden producir lesiones fundamentalmente por dos mecanismos: uno es dependiente de linfocitos T citotóxicos, es el de mayor daño, está mediado por perforinas y granzimas que inducen la apoptosis y el otro por linfocitos T Helper (TH) mediante la síntesis de citocinas pro-inflamatorias. En este último caso, es difícil entender cómo un mecanismo de este tipo podría actuar con tal finura como para destruir unas células y respetar otras íntimamente relacionadas en el espacio (como ocurre por ejemplo con las células beta de los islotes pancreáticos en la diabetes tipo I).



No obstante, en modelos de transferencia pasiva en ratones se ha podido demostrar que células CD4+ con especificidad para antígenos presentes en células beta de los islotes, pueden mediar la destrucción de solo dichas células (Ravinovich G, 2004), tanto que las citocinas pro-inflamatorias provocan la llegada de células cuyo efecto en el daño celular es inespecífico.

Recientemente se ha puesto en evidencia un nuevo mecanismo en la producción de lesiones tisulares en varias Enfermedades Autoinmunes: Tiroiditis de Hashimoto, Diabetes de ratones NOD y Síndrome de Sjögren. En estas entidades la concomitante expresión de Fas y Fas-L, en los tirocitos, en las células beta de los islotes pancreáticos y en el epitelio de las glándulas salivales, correspondientes a los órganos diana de las enfermedades mencionadas, lleva a la muerte por mecanismo de apoptosis (la destrucción se produce entre las propias células al interaccionar Fas-L con Fas). Este mecanismo no requeriría en principio una respuesta autoinmune. Desde esta perspectiva las reacciones autoinmunes formarían parte de una fenomenología más amplia que conduciría a la destrucción de las células o tejidos involucrados (Parslow T. et al, 2001).

### **Colágeno y Autoinmunidad.**

El cartílago esta compuesto de cinco diferentes tipos de colágeno, entre estos es el colágeno tipo II el más abundante (15 a 25%), constituyendo aproximadamente la mitad de su peso seco. (Mayne R. 1989; Poole RA. et al, 1993; Nelson F. et al, 1998),

Las proteínas fibrilares del colágeno tipo II están constituidas por tres cadenas codificadas en los cromosomas 7 y 17 de los osteoblastos y fibroblastos. Son 3 cadenas aminoacídicas 1 alfa (Prockop DJ. et al, 1979; Schultz RM. et al, 1992), codificadas por los genes COL1A1 que son altamente susceptibles a la actividad de factores de transcripción que pueden modificar su síntesis. El colágeno es producido en su mayoría por fibroblastos en los tejidos conectivos. La síntesis del colágeno se inicia en el citoplasma formándose cadenas aisladas que son llevadas al retículo endoplasmático donde los residuos de lisina y de prolina son hidroxilados, mediante

enzimas que requieren  $Fe^{+3}$  y vitamina C como cofactores. La hidroxilación de la prolina hace termoestable a la proteína, mientras que la hidroxilación de la lisina permitirá el entrecruzamiento de varias triples hélices. En estos puntos, las glicosil-transferasas del retículo endoplasmático glicosilan algunos restos de hidroxilisina. De esta forma, la triple hélice es ensamblada quedando los extremos como polipéptidos libres, que pueden plegarse para formar las estructuras globulares. Las triples hélices son transportadas al aparato de Golgi donde son modificadas por sulfatación y fosforilación de algunas serinas. El pro-colágeno resultante terminado es excretado de la célula a través de vesículas secretoras

La conversión del pro-colágeno en colágeno tiene lugar en el espacio extracelular. Los telopéptidos terminales son hidrolizados por proteasas específicas y las triples hélices se ensamblan en fibrillas, momento en el que pueden participar formando otras proteínas del tejido conjuntivo como la laminina. Algunos de los restos de hidroxilisina son convertidos por la lisil-oxidasa en aldehidos reactivos, aldehidos que reaccionan con otros restos de lisina o hidroxilisina para formar los entrecruzamientos.

Los polipéptidos de pro-colágeno difieren de la molécula madura por la presencia de secuencias, en N y C terminal, de polipéptidos de ~ 100 residuos; estos extremos son removidos por aminos y carboxil procolágenopeptidasas, enzimas que son específicas para los diferentes tipo de colágeno. (Peltonen L. et al, 1985; Risteli J. et al, 1999) (Figura 1).

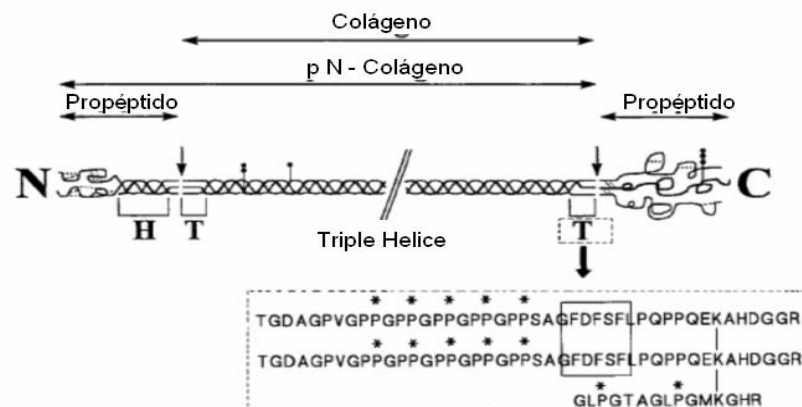


Figura 1. Estructura molecular del colágeno según Risteli J. et al, (1999).

EL colágeno pertenece a una familia de glucoproteínas fibrosas, que se caracterizan por su alta resistencia a fuerzas de tensión, de tracción y de compresión; el colágeno constituye la proteína simple más abundante del cuerpo humano (25% del total de proteínas). A nivel estructural, una molécula de colágeno está compuesta por tres polipéptidos, (de igual o diferente composición de aminoácidos). Una vez terminados los procesos postraduccionales de hidroxilación y glicosilación ocurre la formación de la triple hélice de colágeno. La estabilización de ésta se logra mediante los diferentes puentes de hidrógeno que se forman entre las 3 cadenas. Los que se pueden establecer entre los grupos amino peptídicos de los residuos glicina y los grupos carbonilos peptídicos de los residuos de la otra cadena, o bien entre los grupos hidroxilos de los residuos de Hidroxiprolina y las moléculas de agua. De esta forma aparecen las interacciones cooperativas, ya que cada puente de hidrógeno es débil por sí solo, pero unidos logran la estabilización de la triple hélice (Figura 2).

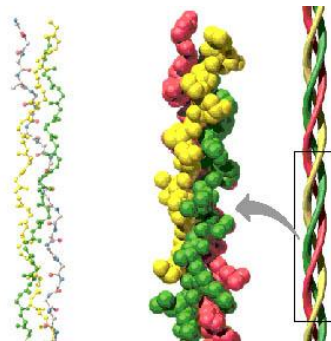


Figura 2. Estructura molecular del Colágeno, formación del hélice tricatenaria1 alfa, hasta la formación de fibrillas. (Schultz RM. et al, 1992)

Una molécula simple de colágeno tipo I tiene una masa molecular de  $\sim 285$  kD, una anchura de  $\sim 14$  Å y una longitud de  $\sim 3000$  Å. Los mamíferos tienen alrededor de 17 cadenas polipeptídicas genéticamente distintas, lo que determina las 13 variantes de colágeno que se encuentran distribuidas en los diferentes tejidos de un mismo individuo. Los diferentes tipos de colágeno pueden estar constituidos por un solo tipo de cadena o por varios. En el caso del colágeno tipo II, la composición de su cadenas es  $[\alpha 1 (II)]_3$  y esta distribuido en el cartílago hialino, el humor vítreo y los discos intervertebrales. (Jimenez SA. et al, 1977).

El colágeno tiene una distribución de aminoácidos muy particular: Gly- X – Y, donde un tercio de sus residuos es glicina, la X es a menudo prolina y la Y hidroxiprolina. La hidroxiprolina confiere estabilidad al colágeno a través de los puentes de hidrógeno que su OH enlaza con las moléculas de agua. El colágeno es sintetizado bajo condiciones en las que el enzima prolina-hidroxilasa está inactiva. Se pierde su conformación nativa (desnaturalización) a 24°C, mientras que el colágeno normal desnaturalizado a 39°C es conocido como gelatina. La enzima prolina-hidroxilasa requiere para su actividad enzimática ácido ascórbico (vitamina C) como cofactor. En el escorbuto caracterizado por deficiencia de vitamina C, el colágeno no puede ser sintetizado en forma de fibras, resultando en lesiones de piel, fragilidad vascular y pobre capacidad de cicatrización.

Los tipos de colágeno I, II y III están estructurados en forma de bandas fibrosas de manera distinta en los diferentes tipos de colágeno, con un periodicidad de 680 Å y un diámetro de 100 a 2000 Å dependiendo del tipo de colágeno y el origen del tejido. Por medio de un modelo de construcción computarizado se ha revelado que las moléculas de colágeno están lateralmente ordenadas y ajustadas.

El colágeno contiene carbohidratos unidos covalentemente por puentes disulfuro a través de residuos 5 hidroxilisil, en una cantidad aproximada de ~ 0.4 a 12% por peso, dependiente del tejido de origen del colágeno. Estos pueden ser detectados en la matriz extracelular por métodos de inmunohistoquímica (Lee SK. et al, 1996). Los carbohidratos presentes son glucosa, galactosa, y sus disacáridos. No se conoce la función de cada uno de los carbohidratos en la molécula de colágeno pero como se encuentran en los espacios vacíos sugiere que están involucrados en el ensamblaje directo de la fibra.

Se conocen varias alteraciones genéticas del colágeno. Una sustitución de aminoácidos en el polipéptido de colágeno rompe la triple hélice o se produce una delección de segmentos del polipéptido. Entre los trastornos mas conocidos están las deficiencias en la síntesis de colágeno causados por una actividad anormal de las

enzimas involucradas en la síntesis del colágeno, tal es el caso del Síndrome de Ehlers Danlos, que se caracteriza por una hiperextensibilidad de la piel y articulaciones. Esta alteración es causada por una mutación de uno de los polipéptidos que inhibe la enzima que remueven los extremos N – C terminal del pro-colágeno. En el Síndrome de Marfan existe una reducción en la estabilidad y cantidad de colágeno tipo I, debido a la mutación del gen FBN1 que codifica la fibrilina 1, está caracterizado por la existencia de huesos frágiles y osteopenia imperfecta (Kuivaniemi H. et al, 1997).

### **La Respuesta Inmune contra colágeno en Enfermedades o procesos Autoinmunes.**

La identificación de estructuras tisulares y moleculares como posibles blancos para la instauración del fenómeno de Autoinmunidad o Enfermedad Autoinmune, es fundamental en la etiología de estos procesos. En procesos fibrosantes como la fibrosis pulmonar idiopática se produce un patrón en el que el antígeno es el colágeno contra el que se desata una respuesta inmune celular. No se conoce los factores que inician el proceso de daño a nivel de epitelio alveolar y/o endotelio vascular pero se estiman que son procesos de inflamación, interacción mesénquina-epitelio, apoptosis epitelial, alteraciones endoteliales y alteraciones en la coagulación (Luzina I. et al 2008); estos mecanismos son redundantes y controlados tanto por factores genéticos como ambientales. Los procesos culminan con el inicio de la reparación (proceso alterado) del tejido. Este mecanismo de reparación conduce a la síntesis de diversos factores de crecimiento y citocinas como TGF- $\beta$  que tiene un rol importante en la regulación de la inflamación, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); ambos actúan sobre los miofibroblastos para su diferenciación en fibroblastos y síntesis de más colágeno, lo que incrementa el proceso inflamatorio y de daño al aumentar localmente la cantidad del antígeno, produciéndose, por tanto, un círculo vicioso característico de la fibrosis que es progresiva e irreversible (Carvajal R. et al 1981; Scotton C. et al, 2007). También se ha encontrado asociación de la fibrosis pulmonar con polimorfismos del gen de fibronectina (FN), (Avila J. et al, 1999).

La Esclerosis Sistémica es una Enfermedad multisistémica del tejido conectivo, caracterizado por gran variabilidad clínica a lo largo del curso de la enfermedad lo que incide también en su pronóstico. (Wigley FM. et al, 1998; Medsger TA. et al 2001; Seibold JR. et al 2001). Se ha encontrado diferencias en las características clínicas y serológicas tanto en la esclerodermia limitada como en la difusa; esto es debido a los polimorfismos genéticos basados en la asociación entre los autoanticuerpos y las moléculas del MHC clase II (Gilchrist FC, et al, 2001; Johnson RW, et al, 2002).

No se conoce el gatillo que desencadena el proceso inflamatorio, pero se estima que es el colágeno tipo I, el que produce una respuesta inmune celular con gran producción de citocinas pro-inflamatorias entre ellas el TNF $\alpha$ , el cual esta involucrado en la patogénesis de la oclusión vascular y/o el remodelamiento del tejido conectivo; esta citocina activa fibroblastos los cuales, como respuesta, producen colágeno tipo I, lo que incrementa el proceso inflamatorio de forma progresiva e irreversible (Atamas S. et al, 2003).

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad crónica, poligénica y multifactorial, predominantemente articular; afecta inicialmente, sobre todo a las pequeñas articulaciones de la mano y de los pies y luego tiende a ser sistémica. Esta enfermedad es ampliamente investigada ya que afecta al 1% de la población mundial siendo la incidencia de 20/100000 al año y la prevalencia de 500/100000 afectados al año (Cooper GS. et al, 2003), con mas frecuencia en mujeres (3:1) entre las edades de 40 a 65 años.

En nuestro medio no existen datos oficiales sobre la incidencia y prevalencia de la Artritis Reumatoide; sin embargo, se estima que es una enfermedad altamente incidente dadas las características genéticas de la población paceña (alta incidencia de haplotipo HLA-DR4), (Tellez M. et al, 1998). Se desconoce la etiología, pero estudios diversos han demostrado una predisposición genética en el locus HLA – DRB1 relacionado con la secuencia de aminoácidos de la tercera región hipervariable (QKRAA, QRRAA, o RRRAA) del MHC clase II. (Gregersen PK. et al, 1997). También se ha descrito factores ambientales como ser: agentes infecciosos (virus de Epstein

Barr, rubéola, citomegalovirus, micoplasma, parvovirus B19, mycobacterias), anticonceptivos orales y el consumo de tabaco; todos juegan un rol importante en el desarrollo de la enfermedad (Gourley M. et al, 2007). En fin, muchas interacciones inmunológicas y genéticas complejas están involucradas en el desarrollo de la actividad clínica de esta enfermedad. Varias investigaciones han demostrado la participación del colágeno tipo II en la génesis de la Artritis Reumatoide; destacan la capacidad de la respuesta inmune humoral contra esta molécula para la inducción de Artritis, la aplicación terapéutica de colágeno en procesos Autoinmunes para la inducción de tolerancia oral y la inducción de Artritis Reumatoide por anticuerpos monoclonales hacia colágeno tipo II, en modelos experimentales.

El fragmento particular del colágeno tipo II contra el que se desencadena una respuesta inmune humoral es CB11 y CB10 (Schulte S. et al, 1998; Cook A. et al, 2004). Varios epítopes han sido identificados en la molécula de colágeno tipo II nativa, particularmente los residuos 359 – 363 en CB11, los cuales fueron reconocidos por varios anticuerpos monoclonales (Schulte S. et al, 1998) y también por sueros de pacientes con Artritis Reumatoide (Burkhardt H, et al, 2002). De acuerdo con estos estudios, la secuencia primaria mínima para la reactividad de los Anticuerpos Monoclonales C1 contra colágeno tipo II era ARGLT (Ala, Arg, Gly, Leu, Thr). El Anticuerpo monoclonal CB 268 reacciona con el mismo epítope, que identifica un *motivo* particular, básico, hidrofóbico, a menudo RRL (Arg, Arg, Leu), este anticuerpo monoclonal era consistente con la construcción de un epítope conformacional con residuos en las cadenas alfa, conformado a partir de un modelo de colágeno II nativo. (Davies JM. et al, 1999; Xu Y. et al, 2004). El colágeno tipo II - C1 y otros anticuerpos monoclonales contra autoepítopes específicos para colágeno tipo II tienen efectos artritogénicos si se efectúa transferencia pasiva a ratones nativos, además se observó *in vitro* efectos destructivos de la matriz del colágeno cuando se agregó a condrocitos cultivados. (Amirahmadi SF. et al, 2004).

La Artritis Reumatoide se genera por inflamación de las articulaciones como resultado de la hiperplasia de los fibroblastos sinoviales y la infiltración de células linfoides,

macrófagos, polimorfonucleares neutrófilos y células plasmáticas (Feldmann M. et al, 1996). Por lo tanto se observa inflamación crónica, respuesta exacerbada hacia los componentes propios de la articulación y desregulación de la apoptosis.

En la figura 3 se esquematiza el conjunto de eventos que se describen ocurridos en la inmunopatogénia de la Artritis Reumatoide. Al inicio existe una etapa de reconocimiento del autoantígeno en individuos genéticamente susceptibles, que lleva a la presentación antigénica por parte de células dendríticas y macrófagos. Las células dendríticas tienen influencia en el resultado de la autoinmunidad por modulación de la respuesta autoinmune, ya que estas tienen una composición diferente de moléculas involucradas en la activación de la célula T (van Duivenvoorde LM. et al, 2007). Las Células T autoreactivas juegan un rol importante en el inicio de la respuesta autoinmune y en el mantenimiento de la inflamación de la sinovial, por activación de macrófagos sinoviales y fibroblastos para producir mediadores de la inflamación. La activación de las células T requiere de dos señales: la primera es una interacción específica del antígeno acoplado al MHC, en la superficie de la Célula Presentadora de Antígeno, con el TCR, y la segunda es a través de las moléculas co-estimuladoras CD28, que se encuentra en la célula T y CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) que se encuentran en la célula presentadora de antígeno. Esta interacción resulta en el incremento de la proliferación celular, producción de citocinas y resistencia a la apoptosis (Lenschow DJ. et al, 1996). Este proceso juega un rol importante en las enfermedades autoinmunes particularmente en la Esclerosis Múltiple (Windhagen A. et al, 1995); en la enfermedad inflamatoria intestinal (Liu Z. et al, 2001); y en la Artritis Reumatoide (Verwilghen J. et al, 1994).

Las células T CD4+ juegan un rol importante en la iniciación de la respuesta inmune, la activación de esta célula incluye la diferenciación en subgrupos denominados TH1 y TH2, existiendo un tercer grupo denominado TH17; estas últimas células tienen un rol importante contra patógenos extracelulares particularmente Gram negativos y hongos (Ye P, et al 2001; Huang W, et al 2004). En los casos en los que estas células son reactivas contra autoantígenos son altamente patogénicas produciendo una severa



inflamación y autoinmunidad. Las TH17 requieren citocinas y factores de transcripción para su diferenciación. Estas células TH17 producen IL-17F; IL-21 e IL-22 (Korn T, et al 2006; Liang SC, et al, 2006; Zheng Y, et al 2006; Nurieva et al, 2007). La familia de IL-17 son un grupo de citocinas que contiene 6 miembros IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) e IL-17F (Yao Z, et al, 1995; Fort MM, et al, 2001 ;Kolls JK, et al, 2004). La IL-17A e IL-17F tienen propiedades pro-inflamatorias, actuando sobre diversas células que expresan citocinas (IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF), quimiocinas y metaloproteinasas; también intervienen en la reclutación, activación y migración de neutrófilos (Kolls JK, et al, 2004). La expresión de IL-17 ha sido detectada en diversas Enfermedades Autoinmunes como Esclerosis Múltiple, Artritis Reumatoide y Psoriasis (Steinman L, 2007). La IL-17 y las células TH17 juegan un rol importante en la inducción y propagación de la autoinmunidad, por ejemplo, en modelos experimentales tratados con un anticuerpo monoclonal anti-IL-17R antagonista o en ratones deficientes de IL-17 se ha visto la existencia de resistencia al desarrollo de Artritis inducida por Adyuvante (CIA) y menor severidad y retardo en el inicio de la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) (Komiyama Y, et al 2006).

Las células NK también tienen un rol importante en la patogenia de las Enfermedades Autoinmunes. Estas células son un grupo de células adicionales de linfocitos que regulan la respuesta autoinmune, inhibiendo la activación y/o proliferación de los linfocitos T (Fort MM, et al, 1998; Smeltz KB, 1999; Zhang B, et al, 1997).

Las células autoinmunes comienzan a reclutarse en el órgano de choque porque a causa tanto, estimulaciones inespecíficas del sistema inmune, como la presencia del antígeno en dicho órgano incrementando su potencial de asentamiento (*homing*), lo que les confiere mayor capacidad de migrar al órgano blanco (Andre I. et al, 1996). En la Artritis reumatoide la célula T activada migra hacia la sinovial produciendo grandes cantidades de citocinas TH1 (IFN  $\gamma$ , IL-2); a su vez la activación de linfocitos T lleva a la diferenciación de células B en células plasmáticas, que producen anticuerpos contra estructuras articulares o contra IgG (Factor Reumatoide) lo que conduce a la formación de complejos inmunes y la consecuente activación de la vía clásica del

complemento en el sitio donde estos se depositan: la membrana sinovial. Las citocinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6) son las responsables de estimular la angiogénesis por parte de las células endoteliales y de promover la proliferación y activación de fibroblastos sinoviales con la producción de metaloproteasas como la agrecanasa (Feldmann M. 2001), colagenasas, catepsinas y radicales libres, capaces, a su vez, de amplificar el fenómeno inflamatorio, inducir la formación del pannus artrítico y provocar la degradación del cartílago y la resorción del hueso mediada por osteoclastos. Se conoce la existencia de inhibidores enzimáticos tales como el TIMP3 (inhibidor de metaloproteinasas 3), que es un inhibidor tisular endógeno de la agrecanasa (en la actualidad, un blanco terapéutico) (Feldmann M. 2001),

Otro fenómeno de destrucción tisular activo es el relacionado con el daño óseo circundante. La osteoclastogénesis es promovida por células que se encuentran en el tejido óseo lesionado e inflamado, el cual es incrementado por las citocinas pro-inflamatorias como TNF  $\alpha$  e IL-1. El receptor activador del factor de transcripción NF $\kappa$ B (RANK) es activado por su ligando RANKL; estas moléculas son esenciales para la diferenciación de osteoclastos, ya que la ausencia de cualquiera de las dos no permite la diferenciación del monocito precursor en osteoclasto. RANKL es expresado en las células T y los fibroblastos del tejido inflamado articular (membrana sinovial) y su expresión esta regulada por citocinas pro-inflamatorias. En modelos experimentales RANKL es inhibida por una molécula llamada osteoprotegerina (OPG), la cual se une a RANKL bloqueando así la interacción con RANK, por lo que la inhibición de RANKL esta siendo considerada un blanco terapéutico para la protección ósea durante el daño articular producido en la Artritis Reumatoide (figura 4).(Schett G. et al, 2005).

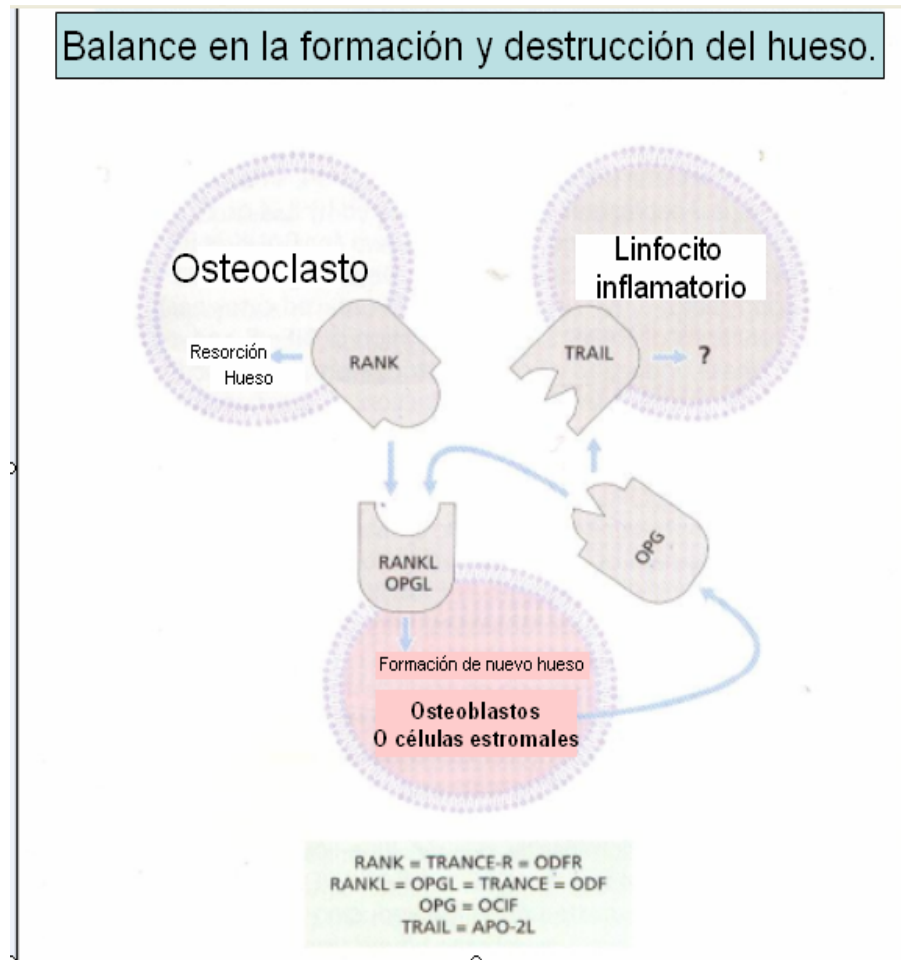


Figura 4. Esquema del balance de la destrucción y la formación de hueso.

El diagnóstico de la Artritis Reumatoide está basado en las manifestaciones clínicas y a menudo es difícil establecer con claridad en estadios tempranos de la enfermedad. El único ensayo serológico de rutina empleado es la determinación de la presencia del Factor Reumatoide en suero; sin embargo, este ensayo no es específico ya que es positivo en otras Enfermedades Autoinmunes, otras enfermedades crónicas, procesos infecciosos y en el 15 % de la población sana, siendo más frecuentes en personas de edad avanzada y hospitalizados; también existe casos de Artritis Reumatoide seronegativos. Por su parte los anticuerpos antinucleares aunque son frecuentes no son específicos de la enfermedad.

Otro criterio de diagnóstico es la radiografía de articulaciones afectadas con lesiones erosivas de cartílago; sin embargo esta solo está presente en etapas tardías de la enfermedad y por lo tanto se asocian con un pronóstico malo.

El tratamiento debe estar dirigido a mejorar la progresión de la enfermedad, evitar la destrucción de la articulación manteniendo su función vital, prevenir el desarrollo de manifestaciones extraarticulares, como vasculitis, serositis y fibrosis pulmonar (Ravinovich G. et al, 2002). Sin embargo, aún no existe una terapia farmacológica capaz de prevenir la progresión de esta enfermedad. Actualmente su tratamiento consiste principalmente en la administración de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) cuya acción es la inhibición de la vía ciclooxygenasa y, con ello, la síntesis de prostaglandinas medida para aliviar solo el dolor, las drogas modificadoras de la enfermedad como las sales de oro, la d-penicilamina, la cloroquina, la sulfasalazina y el metrotexato y los glucocorticoides. Todos estos medicamentos tienen efectos tóxicos graves por lo que se exige un riguroso control.

Entre otras medidas básicas están la fisioterapia para mantener la movilidad articular, pero este manejo no tiene la capacidad de retardar o invertir el proceso de deterioro de la enfermedad. Finalmente algunas personas requieren reemplazos articulares que se hacen quirúrgicamente.

La investigación de los mecanismos implicados en la patogenia de la reacción autoinmune e inflamatoria ha revelado nuevos blancos de terapia génica en esta enfermedad, a través de modificadores biológicos, como antagonistas de citocinas, inhibidores de metaloproteinasas, u oligonucleótidos antisentido, ribozimas o RNA de interferencia capaces de inhibir mediadores tóxicos, citocinas pro-inflamatorias y factores de transcripción (Chernajovsky Y, et al 1998; Jorgensen C. et al, 1998; Ravinovich G. et al, 2002).

Otra alternativa de tratamiento es la terapia biológica a través de anticuerpos monoclonales anti-TNF  $\alpha$  (infiximab) y anti-receptor p75 soluble (etarnecept) los cuales han sido ampliamente utilizados tanto en modelos experimentales como en pacientes (Williams R. et al, 1992; Elliot M. et al, 1994; Chernajovsky Y. et al, 1999)

EL bloqueo de la síntesis de citocinas pro-inflamatorias es otro blanco terapéutico a través del la inhibición de la vía NFkB a diversos niveles (figura 5) (Lipsky PE. et al, 2000; Roman-Blas J. et al, 2006). La vía NFkB es activada por IL-1, TNF $\alpha$ , LPS, virus, CD154 (CD40L), RNAds, radicales libres, rayos UV y radiaciones  $\gamma$ . La vía NFkB tiene

5 miembros: p50, p52, Rel A (p65), cRel y RelB. Rel., p50 y cRel están involucrados en la maduración de las células dendríticas (Pettit AR, et al 1997; 2000; Neumann M, et al 2000; Schulz O, et al 2000; Thompson AG, et al, 2002; Martin E. et al, 2003); p50, cRel en la transcripción de IL-12 (Ouaaz F, et al, 2002); RelB y p50 están asociados con el incremento de la función de las células presentadoras de antígeno y la sobrerregulación de la expresión de CD 40 y MHC en las células B (O'Sullivan K, et al 2000).

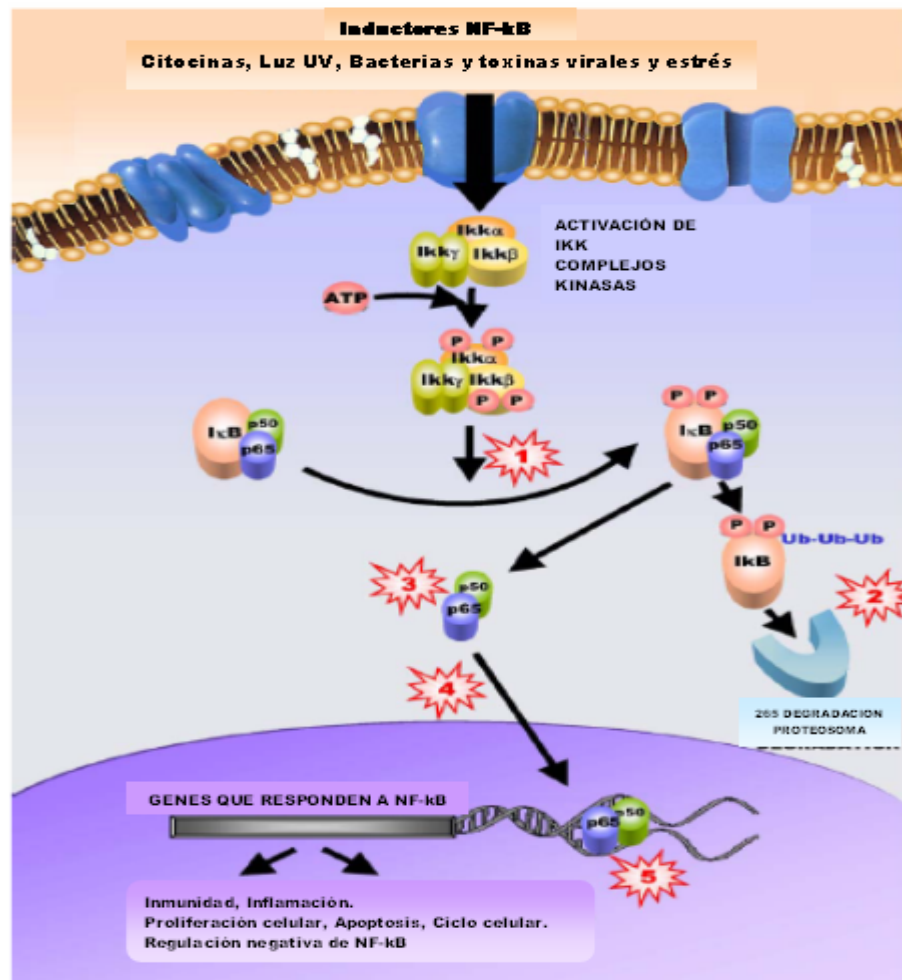


Figura 5. Vía de señalización NF-κB. Los agentes terapéuticos pueden actuar a diferentes niveles:

1. Fosforilación I-κB: AINES (Aspirina, salicilatos, ibuprofeno), 5 aminosalicilato.
2. Actividad del proteosoma: Bortezomib, Ciclosporina A, lactacistina.
3. Disminución de los niveles de NF-κB subunidades p65, p50: RNA si (de pequeña interferencia), *Uncaria tomentosa* (Carvajal, Trabajo en impresión – UMSA; 2008)
4. Translocación nuclear de NF-κB: tracolimo (FK-506); BMS-205820; represión de I-κB,

Otra alternativa de tratamiento en las Enfermedades Autoinmunes, en especial la Artritis Reumatoide es la inducción de la tolerancia periférica a través de la Tolerancia Oral, consiste en la administración del antígeno el cual puede modificar la respuesta inmune. Este proceso terapéutico requiere la administración oral del antígeno y la participación de tejido linfóide asociado a mucosa intestinal, como las placas de Peyer, las células intraepiteliales y las vellosidades intestinales con funciones inmunológicas. Los mecanismos son la supresión de células activas (dosis bajas del antígeno) o anergia clonal o delección (dosis altas de antígeno). Varios estudios en modelos experimentales han demostrado que la administración oral de antígenos o péptidos propios pueden disminuir o suprimir la Enfermedad Autoinmune por cambio en la respuesta de TH1 hacia una respuesta TH2/TH3 (Weiner HL. et al, 1994; Xiao BG. et al, 1997; Krause I. et al, 1999). El efecto en la administración de colágeno tipo II en modelo experimental (CIA o Artritis inducida por pristane) puede suprimir el desarrollo de Artritis Experimental (Thomson HSG. et al, 1985; Nagler AC. et al, 1986; Zhang et al, 1990; Thomson SJ. et al 1993; Thomson SJ. et al 1993; Khare SD, et al 1995), este procedimiento también ha utilizado como terapia en pacientes con Artritis Reumatoide, donde se evidencio mejoría en la clínica (disminución del edema y del dolor) pero no se observó cambios en el VES, en el Factor Reumatoide y en los títulos de anticuerpos anti-colágeno tipo II (Trentham DE. et al, 1993), otro estudio similar mostró que existe asociación entre los niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II y la respuesta al tratamiento con colágeno tipo II (Barnett M. et al, 1998) aunque otro estudio mostró que no existe significancia estadística sin embargo es bien tolerado (Sieper J, et al 1996).

### **Respuesta inmune contra colágeno en la Artritis Experimental.**

Diferentes modelos experimentales de Enfermedades Autoinmunes han ampliado enormemente nuestros conocimientos sobre la posible etiología y patogénesis de estas enfermedades. Para entender los mecanismos que se producen durante el curso de la enfermedad, necesitamos diversos modelos en animales. En la tabla 2 se muestra los modelos experimentales en Artritis (Müller-ladner U. et al, 2005).

Tabla 2. Modelos experimentales en Artritis Müller-ladner U. et al, 2005.

MODELO	EJEMPLO	CARACTERISITICAS Y VENTAJAS
ARTRITIS INDUCIDA POR ANTIGENO	CIA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluar las vías en artritis inflamatoria y erosiva.</li> <li>• Estimulación con antígeno en Background susceptible. Estudio de drogas.</li> </ul>
MODELOS DE MUTACION	MRL lpr/lpr	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evalúa Artritis Autoinmune.</li> <li>• 1 mutación (retrotransposon) lleva a Artritis altamente erosiva e inflamatoria.</li> </ul>
MODELOS TRANSGENICOS	TNF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sobreexpresión de moléculas conocidas para ser involucradas en Artritis humana.</li> </ul>
RATONES KNOCKOUT	Genes diversos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Análisis del rol de moléculas que pueden estar involucradas en la fisiopatología de Artritis y las vías en las cuales estas están moduladas.</li> </ul>
MODELOS HUMANOIDES	SCID	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modelo de Artritis crónica, para el estudio de diferenciación celular, componentes tisulares y vías involucradas.</li> </ul>
CIA: Artritis inducida por colágeno; SCID: Inmunodeficiencia severa combinada;		

Varias investigaciones utilizan modelos de artritis experimental por inmunización con Adyuvante (Kawahito Y. et al, 1998), aceite (Jansson A. et al, 1999), Pristane (Vingsbo – Lundberg C. et al, 1998), componentes de paredes bacterianas (Wilder R. et al, 1999), colágeno tipo II (Remmers E. et al, 1996; Gulko P. et al, 1998; Jirholt J. et al, 1998; McIndoe RA. et al, 1999; Yang H. et al, 1999; Griffiths M. et al, 2000; Vyacheslav A. et al, 2003) y transferencia de anticuerpos monoclonales anti-colágeno tipo II epítipo específicos; en este último se observa exacerbación de la artritis a corto tiempo 3 días. (Miller SD. et al, 1997; Sakaguchi S. 2000). La severidad e incidencia de este último modelo de artritis experimental esta controlada por la dosis de inoculación, la cepa y la edad del animal experimental (Nandakumar K. et al, 2003).

El modelo mas utilizado para el estudio de la artritis reumatoide es la Artritis Inducida por Colágeno tipo II (CIA); este modelo es uno de los que más comparte similitudes patológicas e histológicas con la Artritis Reumatoide humana, donde los anticuerpos juegan un importante rol en la fase inflamatoria.

La susceptibilidad a la inducción de CIA esta asociada con moléculas MHC clase II, pero también depende del tipo de colágeno usado en la inmunización. El colágeno tipo II heterólogo es mas inmunogénico y artrítogénico que el colágeno tipo II homólogo en algunos animales. El modelo CIA puede ser inducido solo en ciertas cepas (DBA/j), sin embargo, se ha logrado inducir el proceso en cepas resistentes a CIA tales como C57BL/6 (H2b) y Balb/c (H2d) donde se observó que el MHC tiene un rol regulatorio importante en el desencadenamiento del proceso inflamatorio de la Artritis Reumatoide (Campbell I. et al, 2000; Nandakumar K. et al, 2006)

La delección de los genes TCR o del complemento causa resistencia en la inducción de CIA (Chiocchia G. et al, 1991; Chu C. et al, 1996; Wang Y. et al, 2000); por su parte, las cepas de ratones deficientes de linfocitos B no desarrollan Artritis inducida por colágeno (Svensson L. et al, 1998; Wang Y. et al, 2000), lo que muestra el papel de la respuesta inmune humoral en el proceso. Inmunológicamente la Artritis inducida por colágeno tipo II en cepas de ratones DBA1/j es dependiente de células T, lo que lleva a la formación de autoanticuerpos para colágeno tipo II que reconocen determinantes antigénicos o epítopes artrítogénicos localizados en el fragmento CB11 del colágeno tipo II; esto activa el sistema de Complemento y de esa manera desencadena el proceso de inflamación característico de la Artritis Humana.

La artritis inducida por anticuerpos anti-colágeno tipo II (AIAC) se obtiene por la administración de un anticuerpo monoclonal para colágeno tipo II y lipopolisacárido (Terato K. et al, 1995; Kagari T. et al, 2002). Comparado con el modelo clásico CIA, el modelo AIAC proporciona muchas ventajas como la inducción rápida dentro de un corto tiempo, independencia del Haplotipo MHC y alta reproducibilidad (Terato K. et al, 1995).

En un modelo experimental en el que se produjo depleción de células CD 25 en ratones DQ8 se encontró un incremento de la severidad y respuesta inmune después de la inmunización. Esto indica que existen células T reguladoras que modulan la artritis (Morgan M. et al, 2004).



En fin todo lo anterior muestra la importancia de la participación del colágeno y de los anticuerpos anti-colágeno tipo II en la Artritis Reumatoide. Sin embargo la presencia de estos dos elementos no parece ser suficiente ya que en los animales en los que se induce anticuerpos anti-colágeno no se presenta signos de inflamación articular si no son animales de cepa susceptibles (Bonsakc A. 2006). El papel de las células T y las moléculas MHC que inducen la respuesta a ciertos epítopes artritogénicos y la inducción de hipersensibilidad tipo IV, con la actividad de citocinas pro-inflamatorias que causan destrucción de tejidos, son fundamentales en el proceso global de la Artritis Reumatoide.

### **Participación de la respuesta inmune contra la Membrana sinovial.**

La membrana sinovial envuelve la articulación, manteniendo una presión negativa y asegurando la presencia de líquido lubricante en el espacio articular. En la membrana sinovial se puede encontrar dos tipos de sinoviocitos A y B. Los sinoviocitos tipo A realizan la función de fagocitos y pueden interactuar con las células T como células presentadoras de antígeno (Edwards JC. 1994). Las células tipo B son fibroblastos en apariencia. Ambos tipos de células tipo A y B pueden sintetizar ácido hialurónico, el mayor componente del líquido sinovial.

Los leucocitos entran al tejido a través de procesos como la adhesión celular a la pared de los vasos sanguíneos, migración a través del vaso y extravasación al tejido; moléculas de adhesión son expresadas en la adhesión y migración (Girard JP. et al, 1995) como L selectina, moléculas de adhesión celular dependiente de glucosilación (GlyCAM-1) y molécula de adhesión intracelular (ICAM-1) en los vasos sanguíneos, los leucocitos expresan antígenos de función linfocitaria (LFA-1). Macrófagos sinoviales pueden usar algunos receptores-ligando para acceder a la membrana sinovial (Koch AE. et al, 1991; Tak PP. et al, 1995), se citan la E- selectina en el epitelio sinovial y molécula de adhesión celular vascular (VCAM 1) e ICAM-1 en células endoteliales y macrófagos. El control de la inflamación en el tejido está regulado por la expresión de quimioattractantes y moléculas de adhesión.

La acumulación de células dendríticas, células T, macrófagos, células B, células plasmáticas y mastocitos, conducen al incremento de la celularidad e hiperplasia sinovial, incrementando la producción de varias citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, IL-17, TNF $\alpha$ , TGF  $\beta$ , quimiocinas, moléculas de adhesión, antígenos de superficie de membrana celular (el Receptor de IL-2, CD27, CD97, CD80 y HLA-DR) y proteinasas (granzimas y catepsinas) (Cutolo M. et al, 2007). El infiltrado celular es difuso u organizado como centros germinales que median la respuesta inmune consecuente a la ruptura de la tolerancia, a través de la expresión de genes activadores de la recombinación de inmunoglobulinas (RAG) de los linfocitos B, lo que conduce a la modificación del receptor (BCR) (Rochas C, et al, 2007).

La sinovial reumatoide, engrosada y edematosa, presenta vellosidades que hacen relieve en la cavidad articular. El tejido sinovial se adhiere a los bordes de cartílago hialino y se transforma en un tejido de granulación llamado pannus, que progresivamente destruye y reemplaza el cartílago. Las superficies opuestas quedan conectadas por masas de fibrina que pueden organizarse y provocar anquilosis fibrosa u ósea. Las alteraciones histológicas que se producen a nivel de la membrana sinovial debido a la inflamación son: hipertrofia vellosa, hiperplasia de los sinoviocitos que se disponen en varias capas mas de 3 (en la sinovial normal solo existe una capa), vasodilatación y edema, infiltración a expensas de linfocitos y células plasmáticas, focos de necrosis fibrinoide; depósitos de fibrina en la superficie y depósitos de hemosiderina en las zonas profundas.

**Otros mecanismos inmunológicos indicadores de inflamación: Procesos de citrulinización, factor reumatoide, proteína C reactiva, velocidad de eritrosedimentación.**

Durante el proceso inflamatorio en la articulación ocurren procesos vinculados a la destrucción tisular. Uno de estos incluye la citrulinización que es un proceso de modificación post-transcripcional donde existe la conversión de la arginina contenida en proteínas, a citrulina, proceso llevado a cabo a través de una enzima llamada peptidilarginina-deiminasa dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  (PAD). Se han identificado cinco isoformas de esta enzima (PAD 1, 2, 3, 4 y 6) (Vossenaar E. et al, 2003, 2004); siendo la isoforma PAD4 la asociada a Artritis Reumatoide (Arita K. et al, 2006), la misma que está regulada por estrógenos. Como consecuencia de la aparición de esta estructura nueva para el sistema inmune (neoantígeno) se forman anticuerpos anti-CCP (péptido cíclico citrulinado) que son autoanticuerpos los cuales se han demostrado ser muy importantes para el diagnóstico de AR. El valor diagnóstico y pronóstico de la medición de anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinizado (anti-CCP) fue evaluado en relación con la afectación articular y daño radiológico en la Artritis reumatoide temprana (Visser H, et al. 2002; Vossenaar E. et al, 2004; Van der Helm – van Mil A. et al. 2005). Se encontró que los anticuerpos anti-CCP pueden ser detectados años antes del desarrollo de los síntomas clínicos. Un estudio prospectivo de un grupo de pacientes demostró que el 93% de los pacientes anti-CCP positivos con artritis no diferenciada finalmente desarrolló Artritis Reumatoide, lo que demuestra el importante valor predictivo positivo de éstos anticuerpos (Kastbom A. et al, 2004; Van Gaalen F. et al, 2004). Además, se pudo determinar el alto poder discriminativo de este marcador entre artritis erosiva y no erosiva. (Van der Helm – van Mil A. et al, 2005).

Otro estudio determinó la especificidad y sensibilidad en estudios clínicos con 311 pacientes con AR, 942 pacientes enfermos de otras Enfermedades Autoinmunes e infecciosas y 330 controles sanos. La sensibilidad fue del 70% y la especificidad fue del 97% para pacientes enfermos con otras patologías y 99% para individuos sanos (Van Gaalen F. et al, 2004).

Las *proteínas citrulinizadas* y la enzima *PAD* no son detectables en articulaciones sanas humanas, ambas están presentes en Artritis Experimental en modelo animal (Lundberg K. et al, 2005). Los títulos altos de anticuerpos Anti-CCP correlacionan con la severidad de la inflamación. (Lundberg K. et al, 2005).

Se han descrito otros anticuerpos relacionados con Artritis Reumatoide como los *anticuerpos anti-factor perinuclear* presente en aproximadamente el 50% de los casos, con una especificidad del 70% (Schellekens G. et al, 1998).

El *Factor Reumatoide* esta conformado por autoanticuerpos anti-gamma globulina de tipo Ig G, Ig M e IgA, con especificidad hacia el fragmento Fc de la IgG principalmente y en menor grado a la IgA. Contribuyen a la formación de complejos inmunes y a la lesión de los tejidos. Fue descrito en primer lugar en la Artritis Reumatoide aunque no es específico de ella porque se encuentra en otras enfermedades de origen reumatológico, como Lupus Eritematodos Sistémico, Síndrome de Sjögren, Esclerodermia, enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades infecciosas e incluso en el 15 % de la población sana.

La proteína C reactiva, es una glucoproteína no presente normalmente en el suero y constituye uno de los reactantes de la fase aguda inespecíficos, que aparecen en infecciones y agresiones hísticas con inflamación.

La velocidad de sedimentación globular, también conocida como "velocidad en la sangre" o velocidad de eritrosedimentación, es una prueba inespecífica. Esta incrementada en procesos inflamatorios, neoplásicos, e infecciosos. No obstante, esta prueba puede usarse para averiguar enfermedades no sospechadas, usándose en la valoración rutinaria y en la evolución de la enfermedad, pudiendo modificarse con el resultado del tratamiento.

### **III. ASPECTOS GENERALES DEL DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.**

#### **a. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Al ser las Enfermedades Autoinmunes un problema de salud, queda clara la importancia de realizar investigación dirigida a esclarecer la etiopatogénesis y a encontrar marcadores de diagnóstico con alta sensibilidad y especificidad, para la prevención y el tratamiento de estas enfermedades, cuya alta incidencia y prevalencia a nivel mundial destaca nítidamente.

Dentro de las Enfermedades Autoinmunes, las Artropatías, en especial la Artritis Reumatoide, tienen alta incidencia en nuestro medio, (afecta al 1% de la población mundial, pero se estima que es mas alta en Bolivia, aunque no existen datos estadísticos). Desafortunadamente no se conocen los factores desencadenantes de la enfermedad ni el papel de los elementos involucrados. Al ser multifactorial, su evolución y pronóstico son inciertos en la mayoría de los casos. Esto se asocia con el hecho de que no se hayan definido aún de manera precisa y definitiva biomarcadores tempranos específicos de esta patología, que permitan medidas de prevención y manejo oportuno, asimismo el desconocimiento de este proceso concuerda con la dificultad de su manejo.

Entre los componentes involucrados se encuentran el colágeno tipo II y los anticuerpos anti-colágeno tipo II descritos en modelos clínicos y en animales experimentales, otros autoanticuerpos y autoantígenos articulares también participan en este proceso. Sin embargo, no se conoce su papel en la Artritis Reumatoide humana, tanto como agente desencadenante o como posible marcador diagnóstico o pronóstico.

**b. PREGUNTA DE INVESTIGACION.**

¿Existe un perfil de distribución característico de los niveles de autoanticuerpos en sujetos con Artritis Reumática y qué significado clínico tiene dicho perfil?

**c. JUSTIFICACIÓN**

Si bien no existen datos oficiales de la prevalencia de la Artritis Reumatoide en Bolivia, puede servir de referencia el hecho de que el Perú tenga una prevalencia del 3% (Cooper GS. et al, 2003). Dado el parecido del patrón étnico con nuestro país, se esperaría que la prevalencia sea similar. A esta idea contribuye el perfil de distribución de los HLA que se asocian a la presencia de procesos autoinmunes (Klein J. et al, 2000).

En un significativo porcentaje de sujetos, la Artritis Reumatoide es una enfermedad altamente lesionante y deformante, que puede llevar a la invalidez. Se asocia este hecho a la instalación de procesos que se acompañan de fibrosis y daño en el cartílago articular. Tal proceso al igual que otros procesos fibróticos puede tener vinculación con la existencia de una respuesta inmune contra colágeno tipo II, lo cual, conduciría a que el daño sea progresivo e irreversible, por tanto altamente lesionante, con deformidad e inmovilidad en las articulaciones afectadas. Para contribuir a desentrañar este hecho, es necesario conocer el perfil serológico en el que se evalúa la respuesta inmune humoral contra colágeno tipo II, tal proceso podría contrastarse con la respuesta inmune contra péptidos cíclicos citrulinizados y la respuesta inmune contra estructuras de la membrana sinovial. En consideración a que la respuesta de anticuerpos no es un hecho que solo tiene significancia en cuanto a la presencia o ausencia de anticuerpos, sino que la magnitud de la respuesta (títulos de anticuerpos) tiene significancia sobre la etiopatogénesis y la evolución, en este trabajo se plantea la búsqueda del perfil de distribución de los niveles de la respuesta humoral contra dichos autoantígenos en sujetos con Artritis Reumatoide, para ser comparado con

otras artralgias. Esta comparación permitirá establecer aspectos relacionados con la significancia de dichos autoanticuerpos.

Para esto es necesario desarrollar procedimientos y estandarizar técnicas convencionales como es el método ELISA e Inmunofluorescencia para la evaluación de estos parámetros serológicos de la respuesta inmune contra colágeno tipo II y membrana sinovial. También es importante calibrar los protocolos, que se ejecutarán con algunos bioreactivos preparados en nuestro laboratorio, para contar con procedimientos validados experimentalmente.

**d. HIPOTESIS.**

El perfil de distribución de los niveles de autoanticuerpos es diferente entre la Artritis Reumatoide y otras artropatías inespecíficas.

**e. ESTRATEGIA DE EJECUCIÓN.**

Para responder a la pregunta de investigación y confirmar o rechazar la hipótesis de este trabajo se propone examinar los perfiles de distribución de la respuesta autoinmune humoral de sujetos con Artritis Reumatoide y otros con artropatías no compatibles clínicamente con Artritis Reumatoide, en comparación con sujetos normales, según lo esquematizado en la siguiente ruta crítica:

**f. OBJETIVOS.****OBJETIVO GENERAL.**

Determinar el perfil de distribución de los niveles de la respuesta de autoanticuerpos en sujetos con artropatía Reumática y en sujetos con artropatías inespecíficas.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Determinar la magnitud de la presencia de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo en sujetos normales, en sujetos con artropatías reumáticas y en sujetos con artralgias inespecíficas.
- Evaluar la presencia de anticuerpos anti-membrana sinovial tanto en los sujetos normales como en las artropatías reumáticas y no reumáticas.
- Explorar la asociación entre niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo y anticuerpos anti-membrana sinovial para análisis de correlación.
- Examinar la asociación entre niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo y anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinizados.
- Evaluar la asociación entre niveles de anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinizados y anticuerpos anti-membrana sinovial.
- Evaluar la asociación entre niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo y la dieta en sujetos normales.
- Evaluar la asociación entre niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo y el tratamiento así como la evolución en sujetos con artritis reumatoide y sujetos con artralgias inespecíficas.



#### **IV. MATERIAL Y METODOS.**

##### **a. Diseño de la investigación.**

###### **Tipo de estudio.**

Es un estudio descriptivo, de corte transversal.

###### **Lugar.**

Instituto de Servicios de Laboratorio y de Diagnostico e Investigación en Salud - SELADIS.

###### **Población y muestra.**

Se estudiaron en tres tipos de sujetos:

- Sujetos con Artritis reumática diagnosticados bajo criterios clínicos (n=40).
- Sujetos con “artralgias” no compatibles con Artritis Reumatoide (n=32).
- Sujetos normales (n=41).

Para evaluar y correlacionar los resultados obtenidos en la determinación de niveles de anticuerpos contra autoantígenos en los diferentes cuadros clínicos, se agruparon a los sujetos de la población estudiada de la siguiente manera:

###### **Criterios de inclusión.**

Sujetos con Artritis Reumatoide diagnosticado por cualquiera de los siguientes criterios.

- Artritis Reumatoide diagnosticada por especialista bajo los criterios del American College of Rheumatology (Arnett FC. et al. 1988).
- Sujetos con artralgias que tienen anticuerpos Anti-CCP positivos.

Sujetos con *artralgias inespecíficas* no compatibles con Artritis reumatoide que cumpla con los siguientes requisitos:

- Dolor articular casual o eventual, que no cumple con los criterios del American College of Rheumatology.
- Valores de Anti CCP (-).

Sujetos aparentemente sanos, sin antecedentes de artralgias recurrentes y en ausencia de infecciones recientes o concomitantes.

### **Datos clínicos complementarios.**

En los casos con artritis reumatoide y artralgias inespecíficas se interrogó sobre (ver anexos):

- Tratamiento (dosis y tiempo de uso). De acuerdo al tipo de tratamiento se definió la siguiente clasificación:
  - A. Antiinflamatorio: AINES, AINES más corticosteroides.
  - B. Inmunosupresor: Metrotexato más corticoides
  - C. Ninguno
- Evolución. Se determinó el grado de mejoría de la siguiente manera:
  - 4. Excelente: si remitió el dolor, si hay movimiento y actividad.
  - 3. Buena: si existe mejoría en el dolor, el movimiento o la actividad.
  - 2. Regular: si existe mejoría solo en alguno de los parámetros dolor, movimiento o actividad.
  - 1. Mala: si no hay mejoría.

Solo en los sujetos normales se interrogó sobre:

- Dieta, se exploró sobre el consumo de cartílago dentro de la dieta y ésta fue clasificadas como:
  - Dieta rica en cartílago, es aquella dieta con consumo de cartílago al menos una vez a la semana.
  - Dieta pobre en cartílago se refiere al consumo de cartílago al menos una vez al mes.
  - Dieta sin consumo de cartílago. No consume cartílago dentro de su dieta.

Todos los sujetos de los tres grupos de estudio tenían entre 18 y 70 años de edad.

El número de sujetos estudiados no responde a criterios de representatividad poblacional.

**b. Ejecución de la Ruta Crítica.**

Con los criterios antes mencionados, evaluados en una entrevista clínica, se realizó la selección de los pacientes que acudieron al Instituto SELADIS, donde se les tomó una muestra de sangre venosa para la determinación de anticuerpos anti-Péptido Cíclico Citrulinizado, anticuerpos Anti-colágeno tipo II nativo y anticuerpos anti-membrana sinovial, según métodos previamente estandarizados. Los ensayos de laboratorio fueron ejecutados sin que el operador conozca la identidad de las muestras. Finalmente se estableció la correlación entre los parámetros clínicos y de laboratorio para obtener los resultados y conclusiones del presente trabajo.

**c. Estandarización de procedimientos y de obtención de bioreactivos.**

**i. Determinación de anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinizado (Anti CCP) por ELISA.**

Para la determinación de Anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinizado se usó un Kit Comercial *Inmunoscan RA* (Nº catálogo RA 96 – RT, Euro-Diagnóstica), siguiendo el siguiente protocolo:

- Las muestras de suero fueron obtenidas a partir de sangre venosa después de permitir que coagule. Se almacenaron las muestras por un máximo de 48 horas a 4 – 8°C.
- Se diluyó la muestra de cada paciente 1:50 (mezclando 10 µl de la muestra en un tubo con 490 µl del tampón de dilución) y se usó 100 µl para el ensayo.
- Se añadió a cada pocillo 100 µl de tampón de dilución.
- Se añadió a cada pocillo control 100 µl de controles negativo y positivo, por duplicado, (sueros de sujeto normal o sujeto con niveles elevados de anticuerpos anti – CCP provistos por Euro-diagnostica).
- Se añadió a cada pocillo experimental 100 µl de cada muestra (suero en el que examina la presencia de anticuerpos que reaccionan con el péptido pegado en la placa) en sus correspondientes diluciones. El tiempo total de pipeteo de los pasos 3 a 6 no excedió los 15 minutos.
- Se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente (18° – 25°).
- Se eliminaron los sobrenadantes de la microplaca y se lavaron 3 veces los pocillos con solución de lavado.
- Se añadió a cada pocillo 100 µl de la solución de conjugado (IgG de cabra anti-IgG humana acoplada a HRP).
- Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente (18° - 25°).
- Se eliminó el sobrenadante del conjugado de la microplaca y se lavó con solución de lavado (3 veces).

- Se añadió a cada pocillo 100 µl de la solución de co-sustratos (TMB 3, 3', 5, 5', tetrametil benzidina).
- Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente (18° - 25°).
- Se añadió 100 µl de solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 0.5M.
- Los valores de absorbancia fueron leídos inmediatamente a 450 nm en un lector ELISA (Avareness)

El punto de corte para establecer los sueros positivos y negativos se obtiene por calibradores según las indicaciones del proveedor (Euro-diagnostica). Sin embargo, en este trabajo, para establecer correlaciones con otros marcadores, se consideraron todas las diferentes absorbancias, independientemente del punto de corte.

## **ii. Estandarización de Procedimientos: Determinación de *Anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo* por prueba de ELISA indirecto.**

### **Consideraciones teóricas.**

En el presente trabajo para detectar anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo se utilizó la técnica de Ensayo Inmunoenzimático en sustrato plástico (poliestireno). El procedimiento se desarrolló con el antígeno obtenido y preparado en nuestro laboratorio y se estandarizó en todos sus aspectos para asegurar su eficacia diagnóstica.

La estandarización y validación de los sistemas de ELISA requiere una secuencia Metodológica preparativa y analítica. La especificidad de los anticuerpos a cuantificar, determina el tipo de sistema para evaluar. Es por lo anterior, que la técnica que fue estandarizada constituye un Sistema de ELISA Indirecto, fundamentado en la titulación de anticuerpos en suero humano que reconocen específicamente a su antígeno adherido a una superficie sintética, complejo que es reconocido por un anticuerpo

policlonal anti-IgG humano acoplado a una enzima que cataliza una reacción de color en un co-sustrato donador de electrones.

La validación de un sistema ELISA, evalúa la exactitud mediante la *linearidad*, que considera cambios en las lecturas de color que son proporcionales a la cantidad de anticuerpos detectados. La precisión es validada según repetibilidad y reproducibilidad (Tijssen P. 1993).

Los procedimientos de los Sistemas de ELISA aplicados en modelos de Autoinmunidad, corresponden a protocolos ya analizados en exactitud y precisión, por lo que la técnica de ELISA indirecto estandarizado en el presente trabajo valida la especificidad determinada en concentraciones experimentales óptimas para anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo, donde se han eliminado la probabilidad de reactividad cruzada, inespecificidad o exceso de reactante.

Por lo demás, se sabe que un suero que contiene anticuerpos contra un antígeno no purificado presentará un porcentaje variable de anticuerpos no específicos que pueden unirse a otras moléculas o al sustrato del polímero de plástico y enmascarar el resultado. (Tijssen P. 1993). Por esto, también se trabajó en este ensayo con colágeno purificado y se evaluó la eficacia en el pegado o coating en el que se determina el rango de concentración de antígeno a ser utilizado.

Finalmente, también se evaluó la posibilidad de interferencia por moléculas cromógenas provenientes de contaminantes de suero tales como la hemoglobina, en el proceso de lectura de la intensidad de color en las fases correspondientes del protocolo ELISA: TMB – Urea – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Por lo anterior, el protocolo general de ELISA requirió la estandarización y normalización de los cuatro eventos principales en el Sistema de ensayos enzimático: Pegado, formación de inmunocomplejos Ag – Ac, concentración de conjugado y revelado de la reacción enzimática (Tijssen P. 1993).

## Obtención y preparación del Colágeno tipo II.

El protocolo utilizado en el presente trabajo esta basado en una secuencia de etapas que ha demostrado resultados altamente reproducibles (Weir M. 1996).

- Se obtuvieron secciones de cartílago de tabique nasal de hocico bovino, el cual fue obtenido de cabeza fresca de res. Cada sección de cartílago fue cortada con escalpelo en direcciones perpendiculares hasta obtener trozos cúbicos menores de 1 mm.
- Para la pulverización de los trozos de cartílago se uso nitrógeno líquido (Carrera de Física – UMSA) en combinación con hielo seco (Praxair S.A.) logrando una temperatura aproximada de  $-120^{\circ}\text{C}$ . El estado físico producido por criodivificación del cartílago facilitó su pulverización en mortero de porcelana. Se colocó el polvo de cartílago en desecador por 2 días, posteriormente se determinó el peso seco.
- Una fracción de polvo seco fue resuspendido en 5 volúmenes de clorhidrato de guanidina 4 M (p/v) (SIGMA, Aldrich Corp.) en medio amortiguador de Tris 0.05 M, pH7.5 para eliminar los proteoglicanos. (Weir M. 1996, [www.chondrex.com](http://www.chondrex.com)).
- Se incubo toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  y con leve agitación; posteriormente se centrifugó a 2000 g. (14000 r.p.m.) por una hora a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Se descartó el sobrenadante, se lavó con ácido acético 0.5 M en tres tiempos de centrifugación a 14000 r.p.m., para eliminar residuos.
- Se sometió a digestión con Pepsina (SIGMA Aldrich Corp.) en una relación de 50:1 cartílago/pepsina, en medio acidificado por acetato 0.5 M permitiendo una digestión por 24 a 48 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación magnética. Este paso permite digerir telopéptidos localizados en el extremo N-terminal y C-terminal de la molécula de colágeno y solubiliza el colágeno de fibras colágenas diferentes al tipo II. La pepsina no digiere los enlaces intra e intermoleculares del colágeno tipo II ([www.chondrex.com](http://www.chondrex.com)).
- La remoción del material insoluble fue realizada por centrifugación a 14000 r.p.m. por 3 periodos de 20 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$  en buffer de acetatos 0.5 M.

- Se recuperó el sobrenadante y se precipitó el colágeno tipo II por adición gradual de Na Cl, agitando hasta lograr una concentración final de 0.9 M de Na Cl. Posteriormente se centrifugó a 14000 r.p.m. por 3 periodos de 20 minutos a 4°C y se resuspendió el precipitado en solución NaCl 0.5 M en tris 0.05 M, pH 7.5. Se dejó en agitación leve en este buffer durante toda la noche a 4°C, para inactivar los residuos de pepsina. Los fragmentos de la digestión péptica se eliminaron por diálisis exhaustiva de la suspensión contra ácido acético 0.5 M.
- Se liofilizó y se guardó a 20°C hasta su uso.

Se determinó la concentración de colágeno tipo II por peso seco y con esto se realizó una curva con Rojo Ponceau, la que nos permitió determinar la concentración en las preparaciones sucesivas del producto.

### Pegado del antígeno.

El proceso de adsorción de moléculas antigénicas a la superficie del polímero es denominado Coating o pegado. En este ensayo se busca la unión de proteínas de estructura fibrilar con la superficie de poliestireno; ésta requiere interacciones hidrofóbicas y polares simultáneas para estabilizar la adsorción y mejorar la unión (Termo Electrón Corporation). Los motivos porque el poliestireno (Figura 6) fue el material utilizado en las placas multipozo son:

- Adsorbe muchos componentes biológicos particularmente proteínas.
- Presenta una excelente calidad óptica con baja absorbancia basal.
- Es resistente a los reactivos químicos utilizados en el procedimiento inmunoenzimático (Termo Electrón Corporation, Gorni, 2003).

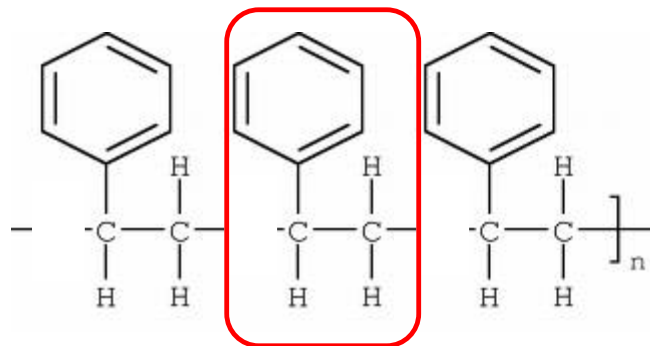


Figura 6. Molécula de poliestireno



Los factores que pueden intervenir con el proceso de pegado y que en el procedimiento de estandarización fueron considerados son:

- La calidad de superficie del poliestireno determinada por la pureza de la materia prima.
- Las propiedades del colágeno como la estructura, polaridad, concentración y otros.
- El tiempo y temperatura del pegado.
- La fuerza iónica y pH de las soluciones usadas como buffers, que pueden ser modificadas por detergentes.
- El bloqueo inapropiado de sitios no saturados.
- La necesidad de lavados exhaustivos para eliminar los reactantes que no participan en la reacción.

La cantidad de antígeno o anticuerpo unido al poliestireno, es crítica en la sensibilidad del ensayo, por lo cual el proceso de pegado fue cuidadosamente ejecutado, no obstante que este paso no define la adecuada orientación molecular, que es impredecible y puede reducir el potencial de sitios de unión, en el caso del colágeno tipo II, dada su estructura fibrilar, este hecho parece no ser significativo. El bloqueo de los sitios no pegados fue llevado a cabo con una solución de caseína/PBS preparada según protocolo calibrado en múltiples ensayos previos de ELISA que utilizan el mismo material (poliestireno) y diferentes antígenos (Tijssen P. 1993).

Para la formación de Ag – Ac, la máxima cantidad de inmunoglobulinas que puede ser adsorbida en monocapa es alrededor de 650 ng/cm<sup>2</sup> (Termo Electrón Corporation). Para que en nuestro sistema pueda unirse la mayor cantidad de moléculas de anticuerpos del suero con el antígeno pegado y que estos puedan mantenerse unidos mientras dure el ensayo, fue necesario otorgar las adecuadas condiciones de pH y fuerza iónica en el medio; esto aseguró la adecuada estabilidad lo que, por lo tanto, determinó la sensibilidad y la precisión del ensayo.

**Estandarización del Procedimiento:**

Para evaluar el pegado, determinar la dilución de suero (anticuerpos) a ser utilizado y definir la concentración de conjugado, se realizó el siguiente procedimiento.

1. El colágeno tipo II a una concentración de 2 ug/ml (Weir M. 1996), se adicionó a placas multipozo en una solución de Tris ClNa (Tris: 0.05 M; ClNa: 0.2 M), a pH 7,4 y se incubó a 4°C por una noche.
2. Se lavó 5 veces con PBS 0.15 M, pH 7,4.
3. El área de la placa no pegada con el antígeno fue bloqueada con PBS/caseína 2% (p/v) (Leche Morinaga con alto contenido de caseína), incubando por 1 hora a 37°C. Se lavó con PBS/Tween 20 a 0.05% (v/v), 5 veces.
4. Se realizó un segundo bloqueo PBS/caseína 2% (p/v), incubando por 1 hora a 37°C y se lavó con PBS/Tween 20, 5 veces.
5. Se incubó con suero, conteniendo anticuerpos a diferentes diluciones en PBS/tween 20 en un volumen de 100 ul por pozo, durante 1 hora a 37°C.
6. Se lavó con PBS/Tween 20 a 0.05% (v/v), 5 veces.
7. Se incubó con diferentes diluciones de conjugado (IgG de Cabra, anti Fc-IgG humana acoplada a peroxidasa de rábano (INC Pharmaceuticals, Inc)), a 200 ul/pozo, por una hora a 37°C.
8. Se lavó con PBS/Tween 20 a 0.05% (v/v), 5 veces.
9. Se colocó 100 ul/pozo de sustrato TMB (Trinity), por 15 minutos a temperatura ambiente.
10. Se colocó solución de parada: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Trinity) 0.13M, en un volumen de 100 ul/pozo.
11. Se midió las absorbancias en lector de placas multipozo ELISA (Avareness), a 450 nm, 630nm.

La correlación existente entre absorbancias generada por la concentración del reactivo coloreado y los títulos es un hecho conocido; por esta razón se utilizó indistintamente

ambos denominativos para referirse a la concentración de anticuerpos séricos específicos.

La presentación del polvo liofilizado de HRP conjugado con IgG de carnero anti-Fc IgG Humano, presenta dos puntos críticos importantes de manipulación para el control de calidad.

- Considerando que la reconstitución debe ser rápida y homogénea, por su higroscopía; se utilizó 2 ml de agua bidestilada y la solución fue alicuotada en viales estériles de 200 ul y guardada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Para la determinación de la dilución de trabajo se efectuaron soluciones semilogarítmicas ( $b^{10}$ ) a partir de la concentración de conjugado en la solución reconstituida en 2 ml de agua bidestilada, desionizada, alicuotado a 200 ul en viales estériles y guardados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Para conocer la dilución óptima del suero en la que se detecta la presencia de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo, se realizó un ensayo multivariable en el cual se realizaron, también, diluciones semilogarítmicas de dicho suero.

### **Preparación del control negativo.**

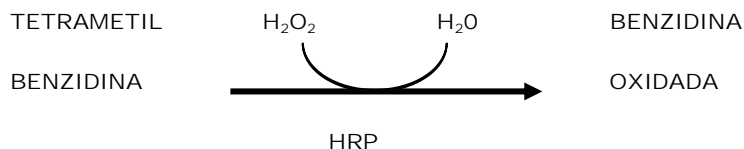
En serología, habitualmente se utiliza como suero control el que se obtiene de personas aparentemente sanas; sin embargo, esto corresponde en general a los estudios de enfermedades infecciosas. En el caso de enfermedades autoinmunes no siempre existe la posibilidad de encontrar sujetos enmarcados en la normalidad, ya que en las personas aparentemente normales pueden ocurrir *fenómenos autoinmunes* (Procesos en los que existe la presencia de efectores autoinmunes como anticuerpos o células T pero no fenómenos de hipersensibilidad que causen daño tisular a diferencia de las Enfermedades Autoinmunes en los que existe daño tisular y manifestación clínica de este proceso). Por tanto, no es suficiente contar con suero control "normal" sino con suero exento de anticuerpos anti-colágeno tipo II; pero que

incluyen es su composición los elementos que otorgan las condiciones fisicoquímicas (presión oncótica, solutos, etc) a la reacción. Para esto, se procedió a preparar un suero libre de estos anticuerpos a través de absorciones seriadas de sueros de sujetos normales (en los que en ningún caso se encontró negatividad con absorbancia cero).

- El colágeno tipo II nativo a una concentración óptima de 100 ug/ml, se adicionó a placas multipozo en una solución de Tris ClNa (Tris: 0.05 M; ClNa: 0.2 M), a pH 7,4 y se incubó a 4°C por una noche.
- Se lavó 5 veces con PBS 0.15 M, pH 7,4.
- Se incubaron los pozos con un volumen de 100 ul de suero por pozo, durante 12 horas a temperatura ambiente, con leve agitación.
- Se recuperó sobrenadante y se adicionó a otros pozos pegados con antígeno, repitiendo el proceso (reabsorción) y el sobrenadante se guardó a -20°C.

Control de puntos críticos en la reacción cromogénica.

El cromógeno empleado en la medición de la actividad de peroxidasa HRP fue la tetrametilbenzidina (análogo no cancerígeno de la benzidina (TMB), Microwell peroxidase substrate System, TMB solution for ELISA), en cuya reacción de cambios de color actúa como donante de electrones, siendo el peróxido de hidrógeno el sustrato enzimático de la peroxidasa.



**Catálisis y reacción enzimática de la oxidación de TMB, donde actúa como donador de electrones durante la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O catalizada por actividad enzimática.**

Durante esta reacción, hasta la medición de la absorbancia, se reconocen dos eventos ajenos a la reacción que en los que se puede generar densidad óptica medible por espectrofotometría: Por un lado, la actividad de peroxidasa endógena, que es necesario ser excluida cuando se emplea HRP como marcador de anticuerpos. Las

células sanguíneas de la serie polimorfonucleares que de alguna forma contaminan el suero obtenido, mantiene su actividad peroxidasa temporalmente (Peroxidase model systems). Por otro lado, los eritrocitos lisados determinan la variación del color normal del suero por la presencia de hemoglobina. Esta molécula metaloprotoporfirínica genera coloración roja al capturar oxígeno la que puede determinarse espectrofotométricamente a 560 nm. La interferencia básicamente se relaciona con la Hb residual presente durante la reacción enzimática de HRP (cuya estructura también es protoporfirínica) con sus co-sustratos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (Lindsay S. et al, 2001). Estas interferencias fueron evitadas o controladas en este trabajo mediante el uso de sueros no hemolisados y por la introducción de un suero control en diferentes diluciones y controles sin conjugado y sin cromógeno.

### **iii. Determinación de anticuerpos anti-membrana sinovial por Inmunofluorescencia Indirecta.**

#### **Inmunofluorescencia Indirecta.**

En este trabajo se montó la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta con tejido sinovial humano. Para esto, se estandarizaron los siguientes puntos:

- a. El lavado del tejido que permite la eliminación de Inmunoglobulinas del donante del tejido depositadas en el espacio extravascular, que por ser de origen humano pueda reaccionar con el conjugado IgG anti-IgG humano Fluoresceína, generando fluorescencia inespecífica.
- b. Las diluciones del suero a ser utilizadas para detectar niveles de fluorescencia que eviten por exceso fluorescencia inespecífica o insuficiencia de este reactante.
- c. Las diluciones óptimas del conjugado IgG anti-IgG Humano – Fluoresceína.
- d. Obtención de suero control negativo.

**Obtención del tejido.**

El tejido sinovial articular humano, fue obtenido de un paciente que se sometió a reemplazo de la articulación de la cadera, por una prótesis. La biopsia obtenida según técnicas quirúrgicas convencionales fue guardada en un frasco con PBS estéril a – 20°C.

**Eliminación de inmunoglobulinas de depósito en tejido sinovial mediante lavados.**

Debido a la posibilidad de que en el tejido sinovial pueda existir inmunoglobulinas depositadas en el espacio extravascular, se sometió el tejido a lavados sucesivos con buffer acetato. Este procedimiento, que se realizó sobre el corte de tejido extendido en el portaobjetos, requiere que la fijación no incluya la presencia de calor o de agentes químicos que desnaturalicen proteínas y precipiten las inmunoglobulinas del tejido, imposibilitando su remoción. De esta forma al no poder utilizar calor ni acetona se ensayo la utilización de una serie de sustancias que hagan que el tejido se adhiera sin despegarse de la placa de vidrio y conserve su estructura. El lavado de las muestras fue realizado con PBS pH 7.4 y Buffer acetato (BA) pH 3.5; este último para la eliminación de inmunoglobulinas que, además de estar depositadas, puedan estar fijadas en tejido sinovial, permitiendo así que estas al modificar levemente su estructura terciaria disminuyamos su afinidad por el pH ácido y se despeguen de los antígenos, en caso de que estuvieran formando inmunocomplejos en los tejidos (Weir M, 1996).

Se realizó un ensayo multivariable en el cual se consignan diferentes números de lavados en tejido fijado con diferentes agentes de pegado. También se varió el buffer de lavado PBS (pH 7.4) y buffer acetato (pH 3.5), la tabla 3 muestra el diseño mencionado. En todos los casos se examinó la presencia de los tejidos en el portaobjetos y después la presencia de fluorescencia inespecífica remanente de la adición del conjugado IgG anti-IgG humano – fluoresceína, sin suero.

Sustancia.	Numero de lavados.									
	Ninguno		20 lavados		30 lavados		40 lavados		80 lavados	
	BA	PBS	BA	PBS	BA	PBS	BA	PBS	BA	PBS
Ninguna.										
Ovoalbúmina										
Goma liquida										
Goma Arabiga										
50%										
25%										
10%										
5%.										
Bálsamo de Canadá										

Tabla 3 Diseño experimental multivariable para la estandarización del pegado del tejido en el portaobjetos para la Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta. PBS Buffer fosfato salino a pH 7.5; BA Buffer de acetatos a pH 3.5.

### **Determinación de las diluciones óptimas del suero y del conjugado fluoresceinado.**

Se realizó un ensayo multivariable con diluciones seriadas de ambos reactantes para definir tanto la dilución óptima del suero, como la del conjugado. Para esto se utilizó un pool de sueros de personas con títulos altos de anticuerpos Anti-CCP.

Las diluciones para determinar la concentración óptima de sueros fueron: 1:20; 1:100 y 1:200. Las diluciones para determinar la concentración óptima de conjugado fueron: 1:100; 1:200 y 1:400.

**Preparación del suero control negativo.**

En consideración a que el suero de personas sanas en ensayos previos contra colágeno tipo II, daba niveles de absorbancia relativamente elevados y ante la incertidumbre sobre la probabilidad de la existencia de anticuerpos anti-membrana sinovial con niveles “normales” en el conjunto de la población o, alternativamente, ante la eventualidad de que esto solo ocurra en algunos sujetos que, precisamente, son los controles usados, se procedió a obtener sueros verdaderamente negativos, esto es, exentos de anticuerpos anti-membrana sinovial, a través de procedimientos de absorción.

Para esto se utilizaron sueros de personas en las que se les determinó anticuerpos anti-CCP positivos y negativos. Para el ensayo se utilizaron las concentraciones óptimas de suero y conjugado, determinados preliminarmente.

Como control positivo se utilizó un pool de sueros anti-CCP (+) con mayor o igual concentración de anticuerpos anti-CCP que el control positivo del kit (Eurodiagnostica), teniendo en cuenta la posibilidad de que los antígenos que se encuentran en membrana sinovial sean los que hayan sufrido el proceso de citrulinización (Vossenaar et al, 2003; Masson-Bessiere C. et al, 2001).

Para la preparación se suero absorbido exento de inmunoglobulinas anti-membrana sinovial, el pool de sueros de sujetos aparentemente sanos, procesado siguiendo el siguiente protocolo:

- El tejido sinovial de la muestra obtenida según procedimientos citados en la página 60, se corto en trozos pequeños con bisturí.
- Se adicionó 400 ml de PBS.
- El material fue sometido a homogenización en una jeringa de vidrio hasta conseguir un aspecto homogéneo.



- Se colocó la suspensión en un frasco estéril en el que se adicionó 400 ul del pool de sueros escogidos.
- Se dejó en agitación toda la noche a temperatura ambiente.
- Se centrifugó a 1500 r.p.m.
- Se recuperó sobrenadante y se reinició el procedimiento con otro monto de tejido homogenizado y se guardó a -20°C.

#### **Determinación de anticuerpos anti-tejido sinovial: procedimiento.**

- La muestra de tejido sinovial fue cortada con micrótopo de congelación con un grosor de 5 um.
- Los cortes fueron pegados sobre un portaobjetos por calor.
- Se dejó en cámara húmeda por 1 hora.
- Se congeló a – 20°C, hasta su uso.
- Se dejó en cámara húmeda por 15 minutos.
- Se lavó con PBS; el número de lavados fue establecido por un ensayo previo.
- Se dejó secar.
- Se fijó con metanol – acetona (v:v) por 30 minutos, sin dejar que el tejido se seque.
- Se **INCUBÓ CON SUERO** de sujetos en estudio (en diluciones preestablecidas con PBS), por 30 minutos, a 37°C, en un volumen de 30 ul por corte de tejido.
- Se lavó con PBS 5 veces.
- Se **INCUBÓ CON DILUCIONES DE CONJUGADO** (anti-inmunoglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína (MP Biomedicals)) en PBS, por 30 minutos, 37°C, a un volumen de 30 ul por corte de tejido.
- Se lavó con PBS, 5 veces.
- Se incubó con azul de Evans, por 5 minutos.
- Se lavó con PBS, 5 veces.

- Se observó en un microscopio de fluorescencia (Olimpus). La observación al microscopio fue efectuada dentro de los treinta minutos después del último lavado \*.

#### **iv. Otros Marcadores.**

Se realizaron las técnicas convencionales para determinar la concentración de Factor Reumatoide (Test de aglutinación, Human), determinación de la concentración de Proteína C Reactiva (Test de Aglutinación, Human) y la velocidad de Eritrosedimentación (Método de Westergren). Estas pruebas no fueron parte sistemática de este estudio y solo se practicó en algunos sujetos de acuerdo a la demanda de los especialistas.

#### **d. Análisis estadístico.**

El Test Kruskal - Wallis fue usado para comparar los grupos de estudio.

El T de student fue usado para examinar diferencias entre los grupos (modos) encontrados en los perfiles de distribución de los sujetos de estudio.  $p$  menores de 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

Se utilizó regresión lineal para conocer la correlación entre los grupos de estudio.

Se utilizó el programa estadístico SPSS 12.0 de Windows para la realización de los gráficos, en los que construyeron las curvas de densidad – frecuencia de Kerner.

---

\*Dificultades de orden técnico impidieron contar con imágenes fotográficas en este trabajo.

## V. RESULTADOS.

### i. **Determinación de anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinizado (Anti-CCP) por ELISA indirecto.**

La citrulinización es un proceso por el cual se convierte residuos de arginina a residuos de citrulina a través de una modificación de deimidación post-transcripcional modulado por una enzima  $\text{Ca}^{++}$  dependiente la Peptidil arginina deimidaza PAD (Vossenaar E. et al, 2004, 2003). Este proceso se lleva a cabo en proteínas presentes en las articulaciones y puede ser el posible mecanismo de la inducción de autoinmunidad en la respuesta de las células T  $\text{CD4}^+$  en procesos artritogénicos como la Artritis Reumatoide (Así, la formación de anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinizado es considerado como un marcador temprano de la enfermedad, por su alta sensibilidad y especificidad).

En la figura 7 se observa la determinación de anticuerpos Anti-CCP en los tres grupos de estudio. En los pacientes con Artritis Reumatoide de una población de 40 sujetos estudiados solo 22 (55%) presentaron positividad para Anticuerpos Anti-CCP; 18/40 (45%) fueron diagnosticadas como Artritis Reumatoide con base en criterios clínicos pero no presentaron positividad para anticuerpos anti-CCP.

En los Pacientes con Artralgias inespecíficas no compatibles con Artritis Reumatoide y en personas aparentemente sanas, ninguno presentó anticuerpos Anti-CCP. Lo anterior muestra que es altamente específico pero poco sensible. Los niveles de anticuerpos anti-CCP fueron muy variables en los sujetos estudiados (entre 25 UI/ml y 2130 UI/ml).

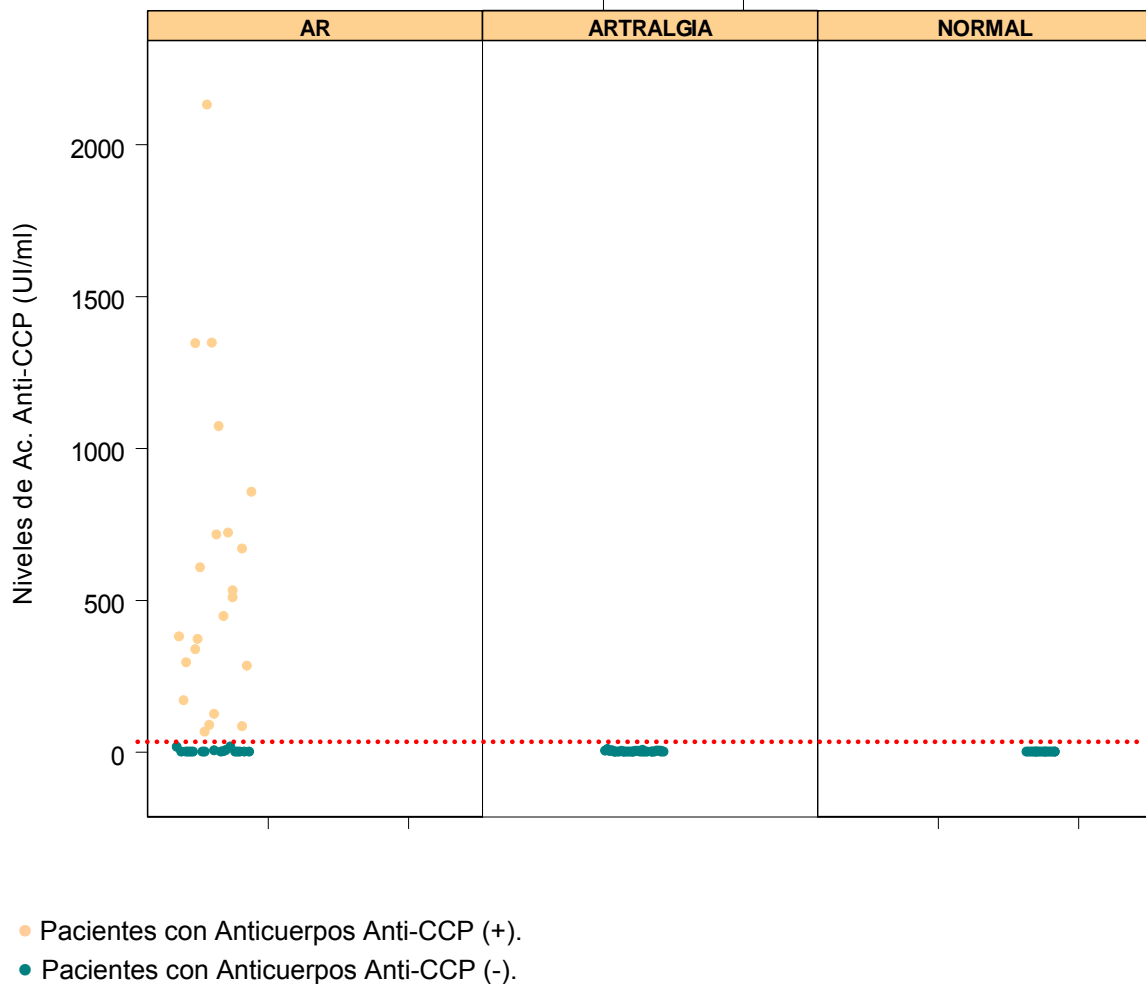


Figura 7. Determinación de Anticuerpos Anti-CCP, en los tres grupos de estudio (Artritis Reumatoide, Artralgias no compatibles con Artritis Reumatoide, y otro tipo de artralgias no compatibles con las Reumatológicas).

El promedio de la población positiva para anticuerpos anti-CCP (excluyendo a los negativos) es de 329.7UI/ml y una desviación estándar de 477.85.

La figura 8 muestra que en la distribución de Anticuerpos Anti-CCP con títulos mayores a 25 UI/ml, en pacientes con Artritis Reumatoide, se discrimina claramente dos poblaciones, un modo mayor esta cerca de 400 UI/ml, pero hay sujetos con valores superiores a 2200 UI/ml que corresponden al modo menor, sin embargo, existe una tercera curva extensamente solapada con la de menores títulos.

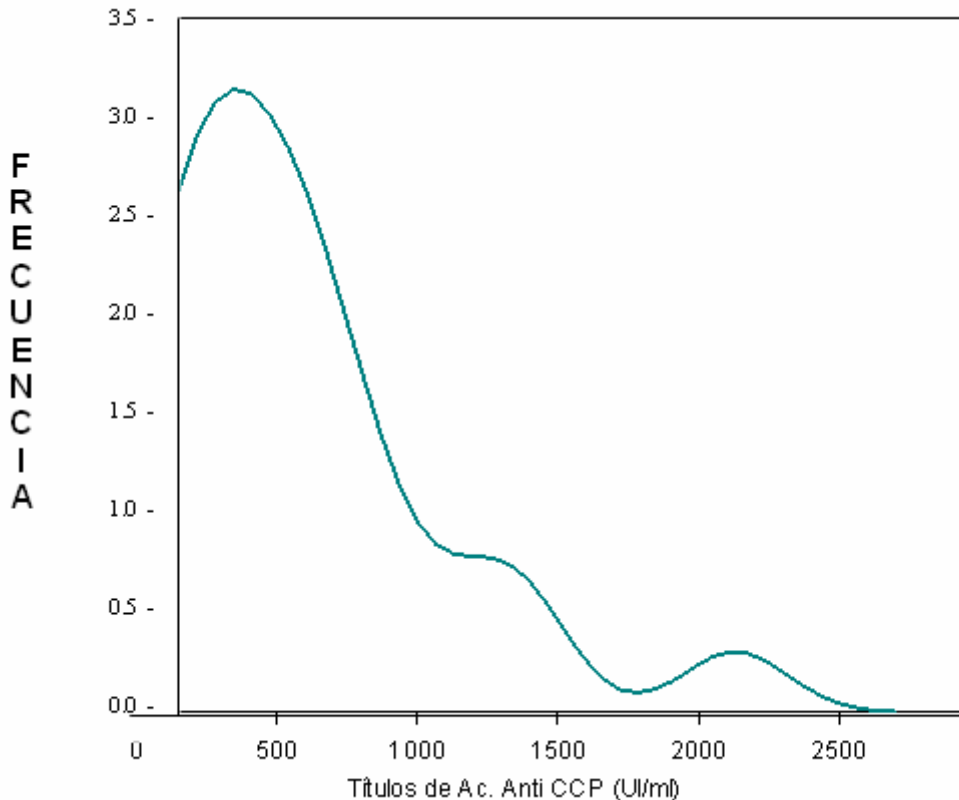


Figura 8. Curva de distribución de frecuencia de Anticuerpos anti-CCP, en pacientes con Artritis Reumatoide con anticuerpos anti-CCP positivo.

## ii. Estandarización de Procedimientos para la determinación de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo por ELISA indirecto.

Los linfocitos B juegan un rol importante en el desarrollo del ataque y la severidad de reactividad autóloga de las Enfermedades Autoinmunes, en de especial aquellas mediadas por la formación de complejos inmunes circulantes o inmunocomplejos (hipersensibilidad tipo III), como ocurre en la Artritis Reumatoide.

En esta enfermedad se produce un proceso de selección pre-inmune de Linfocitos B, que tienen acceso a epítopes artritogénicos en la superficie intacta de tejido cartilaginoso (Schulte S. et al, 2000; Nandakumar K. et al, 2004). En estudios experimentales se ha comprobado la síntesis de autoanticuerpos por los Linfocitos B hacia epítopes artritogénicos de colágeno tipo II y hacia segmentos aminoacídicos de

IgG. (Hanly W. 1994; Lynn R. et al, 1995; Edward F. et al, 1996; Chang J. et al, 1998 ; Morris H. et al, 1999; Schulte S. et al, 2000; Nandakumar K. et al, 2003, 2004). La determinación de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo es, por lo tanto, un procedimiento para examinar el proceso artritogénico.

Para evaluar esta respuesta se desarrollo y estandarizó los diferentes pasos para el ensayo inmunoenzimático. En este capítulo se muestra, en inicio los resultados de dicho proceso de estandarización.

#### **a. Estandarización de Procedimientos.**

Para poder evaluar con suficiente certidumbre la presencia de anticuerpos contra colágeno tipo II nativo, (también contra estructuras de la sinovial articular y tejidos asociados), en este trabajo se desarrollaron procedimientos y se estandarizarón técnicas que permitieron su validación. Lo anterior responde a la necesidad de normalizar los protocolos que se ejecutaron con bioreactivos preparados en nuestro laboratorio y al requerimiento de contar con las concentraciones óptimas de reactantes y con procedimientos validados experimentalmente. En este marco, se muestra al inicio de este subcapítulo, los resultados de los procesos de estandarización ya que estos fueron parte importante del desarrollo de esta tesis.

#### **Determinación de las diluciones óptimas de los reactantes.**

Considerando que una proporción importante de los Péptidos cíclicos citrulinizados constituyen parte de la estructura de la proteína de colágeno tipo II (Koivula M. et al, 2007), se estimo la posible existencia de una correlación entre anticuerpos anti-CCP y anti-colágeno tipo II nativo en los sujetos afectados. Tal posibilidad podía expresarse en los sueros con alto titulo de anticuerpos anti-CCP los cuales darían respuestas positivas para colágeno tipo II, Con este entendido se seleccionaron sueros con altos títulos de anti-CCP y con ellos se estandarizó la prueba para determinar tanto la concentración óptima de sueros a ser utilizado en este estudio, como la concentración de conjugado.

El proceso de obtención de anticuerpos monoclonales conjugados con HRP (Horseradish Peroxidase) genera un producto altamente concentrado, por lo que se vio la necesidad de establecer ciertas consideraciones analíticas para su uso. Entre estas resalta el hecho de que el proceso de lavado, no garantiza ausencia de interacciones inespecíficas cuando se trabaja a elevadas concentraciones de conjugado. Para esto se realizaron diluciones a 10 X del conjugado IgG anti-IgG Humano-HRP, en búsqueda de la dilución óptima del mismo.

La figura 9 muestra una relación de proporcionalidad entre la concentración del conjugado y la absorbancia obtenida en sueros en diferentes concentraciones. Se evidencia la existencia de interacciones inespecíficas a las diluciones 1/100 y 1/1000, que disminuyen gradualmente cuando se incrementa la dilución. Esta interacción se pone en evidencia también con la utilización de conjugado solo. A diluciones 1/10000 y 1/100000 se tiene valores de absorbancias medios en la escala presentada, mientras que a dilución 1/1000000 para adelante las absorbancias son casi insignificantes en ambos grupos de sueros utilizados en las diferentes diluciones (sueros anti-CCP positivos y negativos). La concentración de *conjugado* adecuada se sitúa entre diluciones de 1:10000 y 1:100000 por lo que, para su uso en los siguientes pasos se preparó una concentración intermedia entre estos valores.

En la figura 9 también se observa que la concentración de *suero* adecuada para la determinación de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo, por la linealidad obtenida, es la dilución 1:100. No se ensayaron diluciones mayores a 1:100 debido a que en ensayos previos se encontró ausencia de reactividad a mayor dilución.

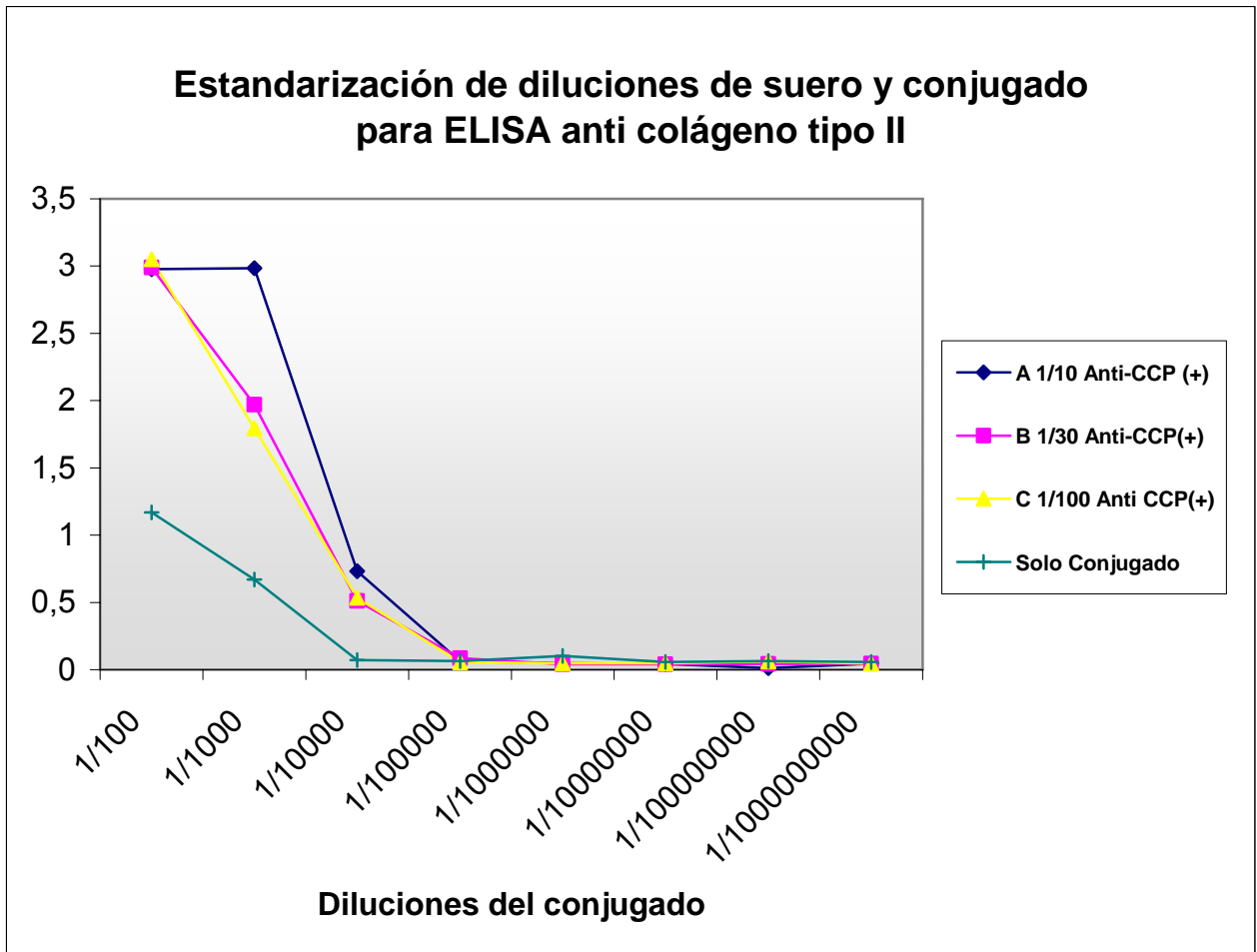


Figura 9. Para evitar las interacciones inespecíficas por exceso de reactantes se determinó la relación de diluciones de Conjugado HRP Ac. Anti-Fc Humano, la dilución de Suero Humano-Ac. Anti CCP (+). Las diluciones de los sueros humanos fueron 1/10, 1/30 y 1/100 (A, B y C son sueros con títulos altos de anticuerpos anti-CCP). La interacción Ac séricos – conjugado HRP Ac. Anti-Fc humano se detectó por ELISA indirecto cuantificado en Lector de Microplacas multipozo a 450 nm. Se observa una relación de suero humano y conjugado de carácter proporcional.





Para normalizar el proceso de dosificación de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo, se tuvo la necesidad de contar con un control negativo adecuado para lo cual se uso pool de sueros de personas aparentemente normales, en las que se determinó previamente anticuerpos anti-CCP los cuales presentaron títulos bajos. Este pool fue absorbido y reabsorbido para su uso. La figura 11 nos muestra que el pool de sueros reabsorbidos puede ser considerado como control verdaderamente negativo en la determinación de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo. Estimamos que este bioreactivo (suero total sin anticuerpos anti-colágeno tipo II) cuenta con todos los elementos propios del suero como la presión oncótica, densidad, etc. los que juegan un papel importante en la reacción antígeno anticuerpo; por tanto tiene un comportamiento mas consistente que la solución de BSA utilizada como control negativo en otros trabajos (Burkhardt H. et al, 2006; Mullazehi M. et al, 2007). Sin embargo, el hecho de que los sueros reabsorbidos aparentemente contengan reactividad, no obstante a la absorción, se da por la presencia de interacciones inespecíficas entre la colágena y los anticuerpos, la cual sin embargo, es de proporciones muy escasas.

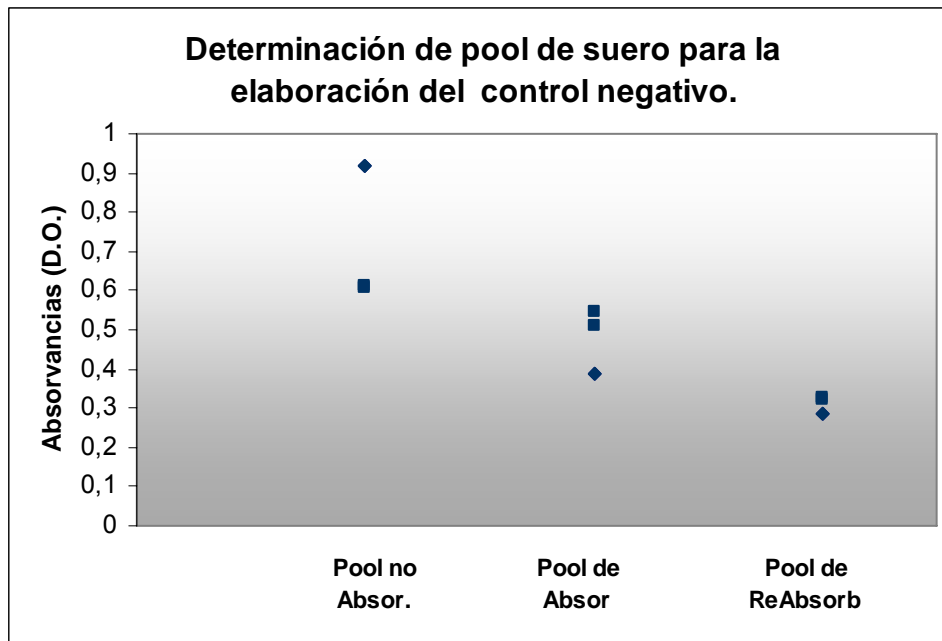


Figura 11. Elaboración del control (-) para la determinación de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo. Se preparó un pool de sueros los cuales fueron sometidos a reabsorción con colágeno tipo II, a una concentración de 100 ug/ml, en movimiento por 12 horas; el suero reabsorbido fue sometido a este procedimiento en dos oportunidades. La dilución de suero para este ensayo fue de 1:100 y de conjugado 1:32000.

### iii. Determinación de títulos anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo por ELISA.

En este trabajo se determinaron los títulos (absorbancias) de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo en los tres grupos de estudio. La tabla 4 muestra los promedios de edad en los grupos (Sujetos con Artritis Reumatoide y sujetos con artralgiias inespecíficas) son muy similares 42.5 años, DE 15.03 y 48 años DE 13.7. El grupo de sujetos normales contaba con un promedio de edad de 27 años y una desviación estándar de 7.9. La mayor parte de los sujetos examinados en los tres grupos corresponden al sexo femenino (90%, 81% y 80% respectivamente). El primer grupo, que corresponde a pacientes con Artritis Reumatoide, diagnosticados según los criterios del American College of Rheumatology, dio un promedio de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo de 0.577, con una desviación estándar de 0.288. El segundo grupo representa a las pacientes que sufren dolores articulares inespecíficos no compatible con Artritis Reumatoide, presentando un promedio de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo de 0.473 con una desviación estándar de 0.192. En el grupo de sujetos aparentemente sanos presenta un promedio de 0.506 (densidad óptica), con una desviación estándar de 0.199.

Tabla 4. Características de 72 pacientes con algún tipo de artralgiias y sujetos normales en estudio (41).

CLASIFICACIÓN	No.	Edad prom.	D.S.	Sexo		Prom. Ac. Anticolag D.O.	D.S.	Prom. Ac. Anti CCP U.I.	D.S.
				F	M				
<b>ARTRITIS REUMATOIDE</b>	40	42.5	15.03	36	4	0.577	0.288	329.7	477.8
<b>ARTRALGIAS INESPECÍFICAS</b>	32	48.05	13.7	26	6	0.473	0.192	1.9	2.045
<b>NORMALES</b>	41	27.7	7.9	33	8	0.506	0.199	0	0

La comparación entre grupos muestra que no existe diferencia estadística entre el grupo de sujetos con artralgias inespecíficas y el grupo de los normales ( $p = 0.5 - 0.4$ ). La comparación entre el grupo de Artritis Reumatoide y los normales no muestra diferencia estadística ( $p = 0.2$ ), de la misma manera que lo que ocurre entre Artritis Reumatoide y sujetos con artralgias inespecíficas ( $p = 0.1 - 0.05$ ).

En la figura 12 se muestra los títulos de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo de todos los sujetos de los tres grupos. Se puede observar que en los grupos de sujetos normales y sujetos con artritis reumatoide existen una gran dispersión de títulos con algunos casos con niveles altos que sobrepasan una desviación estándar: 6/41 (14.5%), aunque no existen sujetos con valores mayores a las dos desviaciones estándar. Semejante figura se presenta en los pacientes con artralgias no compatibles con AR ya que solo 4/32 (12.5%) presentan títulos altos, pero ninguno pasa las dos desviaciones estándar del promedio del grupo de sujetos normales.

En el grupo de pacientes con Artritis Reumatoide se presenta un número mayor de sujetos con títulos altos de anticuerpos Anti-colágeno tipo II nativo, 11/40 (28%), que pasan una desviación estándar; entre estos, hay sujetos con niveles altos de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo que sobrepasan las dos desviaciones estándar 8/40 (20%). Además se puede notar que en este grupo también hay sujetos con niveles bajos de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo.

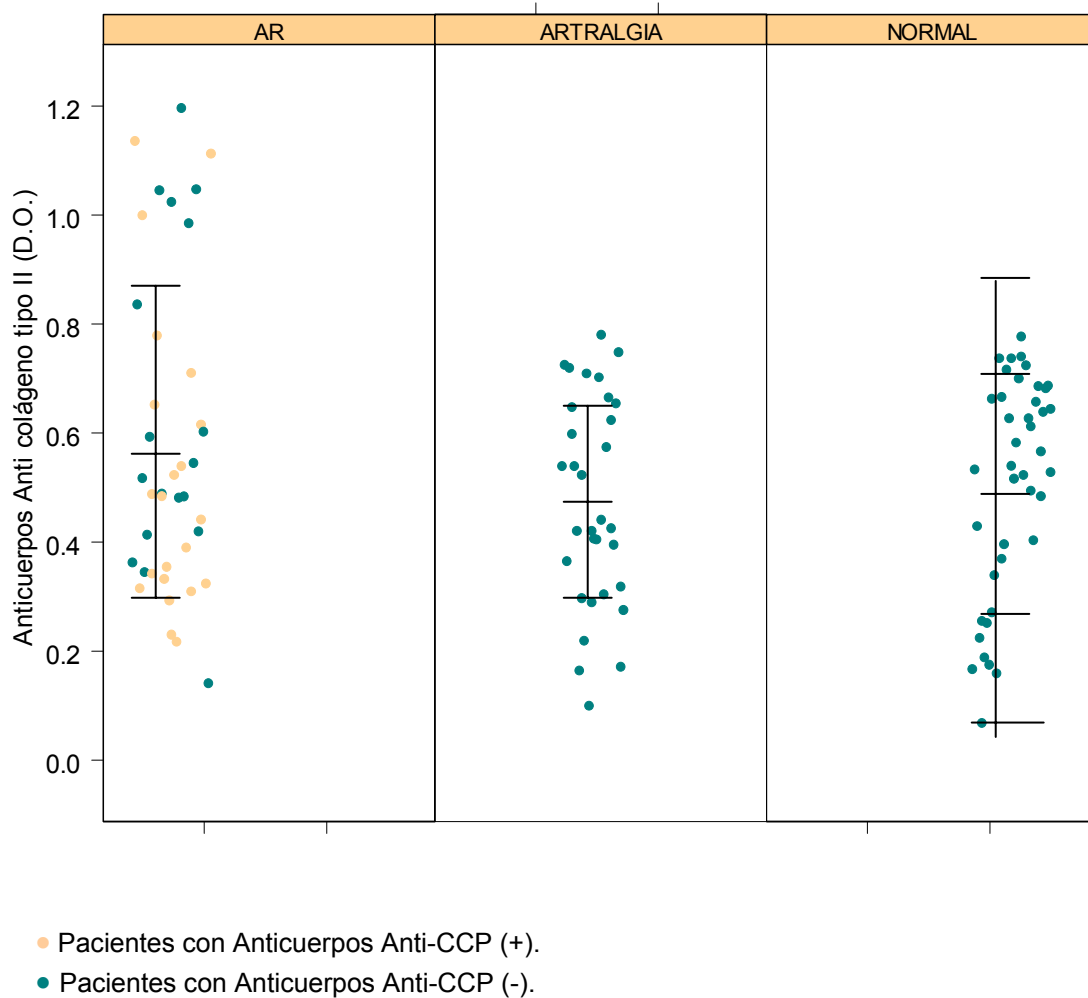


Figura 12. Determinación de Anticuerpos Anti-colágeno tipo II nativo, en los grupos de estudio (Artritis Reumatoide, Artralgias inespecíficas y los normales). No se observan diferencias entre los tres grupos.

Por lo demás, es posible observar que, no obstante a la dispersión de los datos, estos tienden a acumularse alrededor de ciertos valores. Para elucidar este hecho se elaboraron gráficas que muestran las frecuencias en el conjunto de los sujetos examinados y también en cada uno de los grupos.

Como se observa en las figuras siguientes se aprecia que cada grupo muestra un perfil de distribución totalmente diferente. Así en la Figura 13 del grupo de sujetos normales, se observa una curva bimodal, en la que el primer modo está alrededor de 0.2 (D.O.) y el segundo modo está alrededor de 0.66 (D.O.), mostrando la existencia de un grupo de bajos títulos y otro de títulos mayores, lo que puede tener connotaciones importantes en su interpretación. Examinando la posibilidad de que ambos grupos (modos) sean diferentes, se realizó un análisis estadístico en el que ambos grupos se conformaron incorporando en cada uno a todos los sujetos que se incluyen en la curva proyectada (figura 13), La prueba t muestra que hay diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ) entre los dos modos.

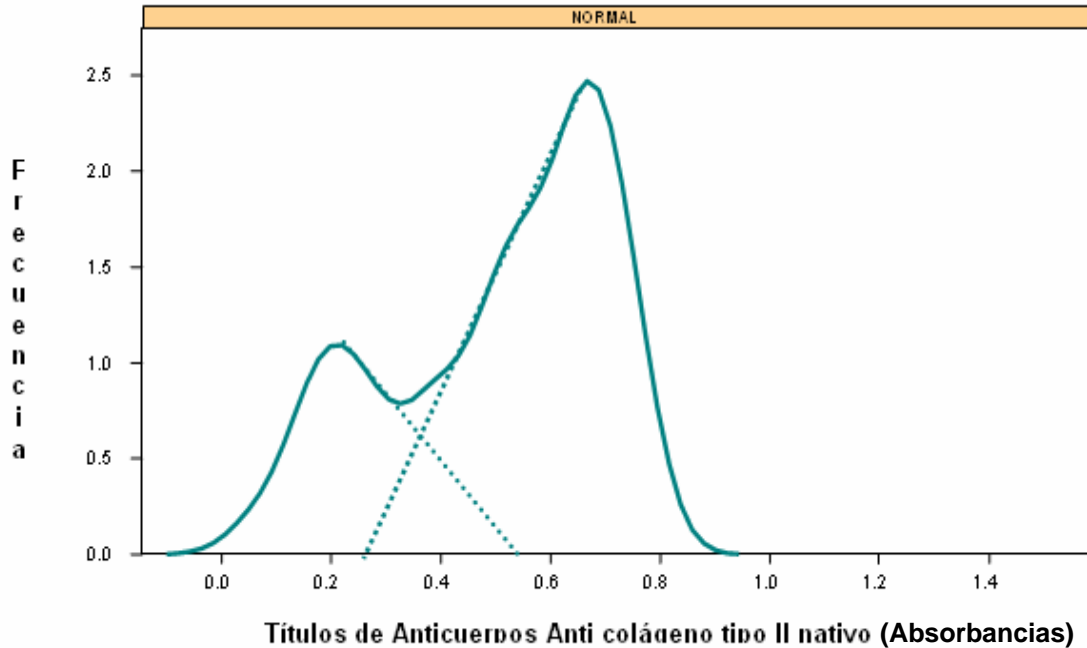


Figura 13. Curva de densidad de los títulos de Anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo en los sujetos normales, observándose dos modos, uno de títulos bajos y otro de títulos mayores.

Por su parte, en los sujetos con Artritis Reumatoide (Figura 14) también se aprecia, con mucha evidencia, la existencia de dos poblaciones, una de títulos bajos y otra de títulos altos que incluye el 20 % de sujetos y que supera las dos desviaciones estándar del promedio general. Los picos de ambos modos corresponden a 0.441 D.O. y 1.014 D.O. que son drásticamente diferentes al perfil de los sujetos normales. Haciendo el mismo procesamiento de datos que el realizado para los sujetos normales, se encuentra también una diferencia estadísticamente significativa entre los dos modos ( $p < 0.001$ ).

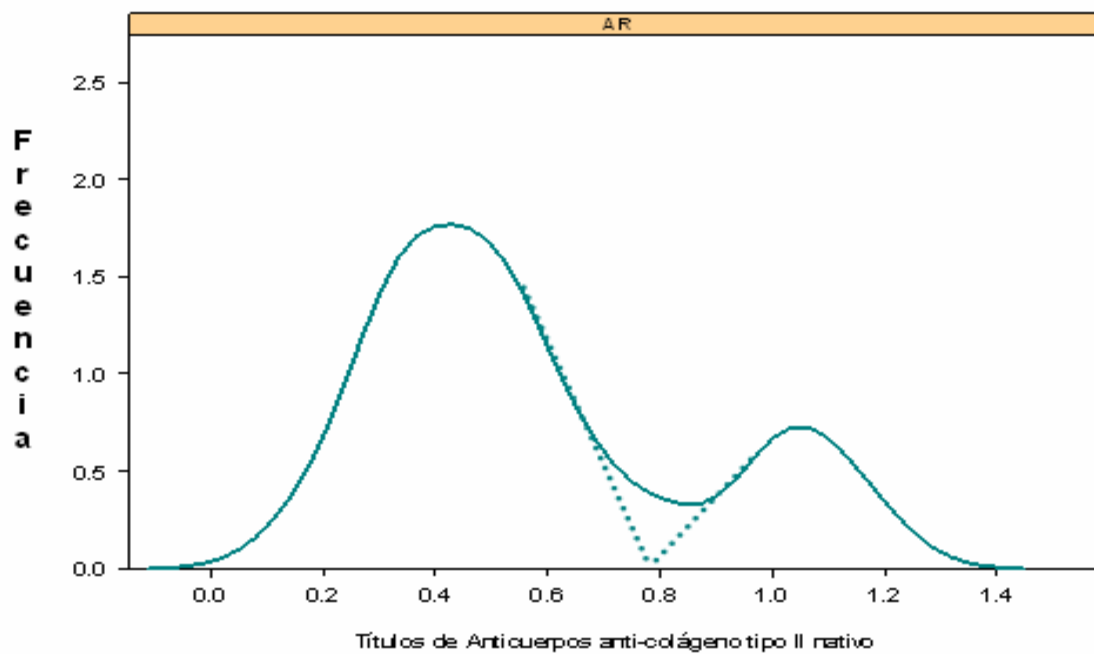


Figura 14. Curva de densidad de los títulos de Anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo en los sujetos con Artritis Reumatoide. Se aprecia, la existencia de dos poblaciones, una de títulos bajos y otra de títulos altos que incluye el 20 % de sujetos y que supera las dos desviaciones estándar del promedio general.

En el grupo de sujetos que reportan Artralgias inespecíficas no compatibles con Artritis Reumatoide (Figura 15), la curva de distribución también es bimodal, con una distribución de frecuencias en la que el primer modo corresponde a títulos más altos que los sujetos normales (0.413 D.O. vs 0.346 D.O.). Existe diferencias estadísticamente significativas entre los dos modos ( $p < 0.05$ ).

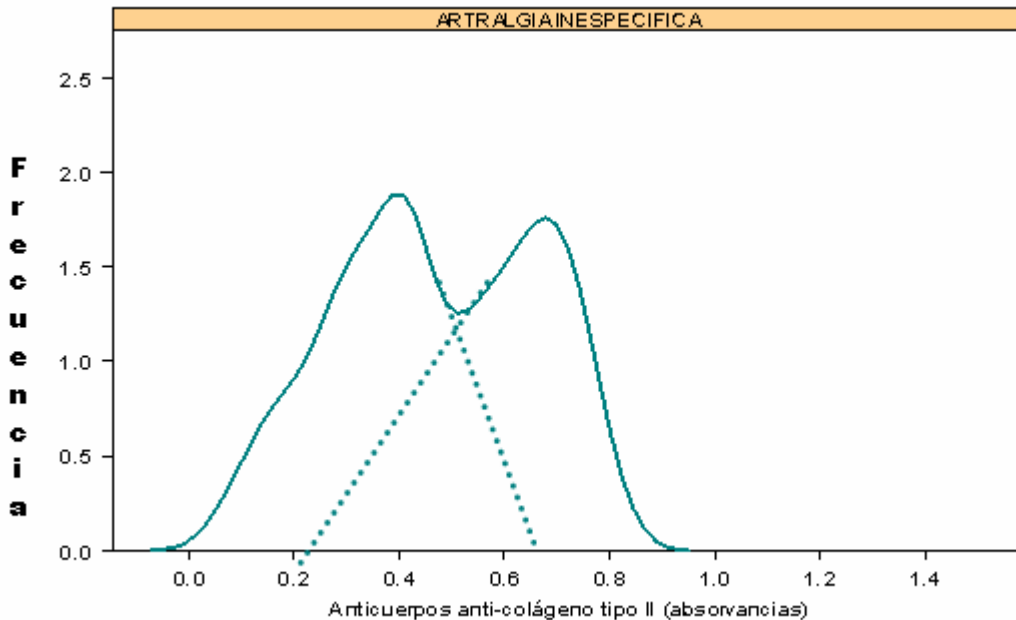


Figura 15. Curva de densidad de los títulos de Anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo en los sujetos con Artralgias inespecíficas. La curva de distribución también es bimodal, con una distribución de frecuencias en la que el primer modo corresponde a títulos más altos que los sujetos normales.

Comparando las curvas de densidad de los tres grupos de estudio en conjunto (figura 16) se observan diferencias lo que permiten definir perfiles propios para cada entidad patológica. Sin embargo, es importante subrayar que algunos grupos (modos) comparten su ubicación entre los tres grupos de estudio. Así, los sujetos normales y los que refieren artralgias inespecíficas tienen el modo de títulos elevados en la misma ubicación (pico 0.67). Igualmente, el modo de título bajo de las artralgias inespecíficas tiene la misma ubicación que el pico de títulos bajos de los artríticos (0.4 y 0.44); solo el pico más bajo de los normales y el más alto de los artríticos son de carácter específico no comparables entre grupos.



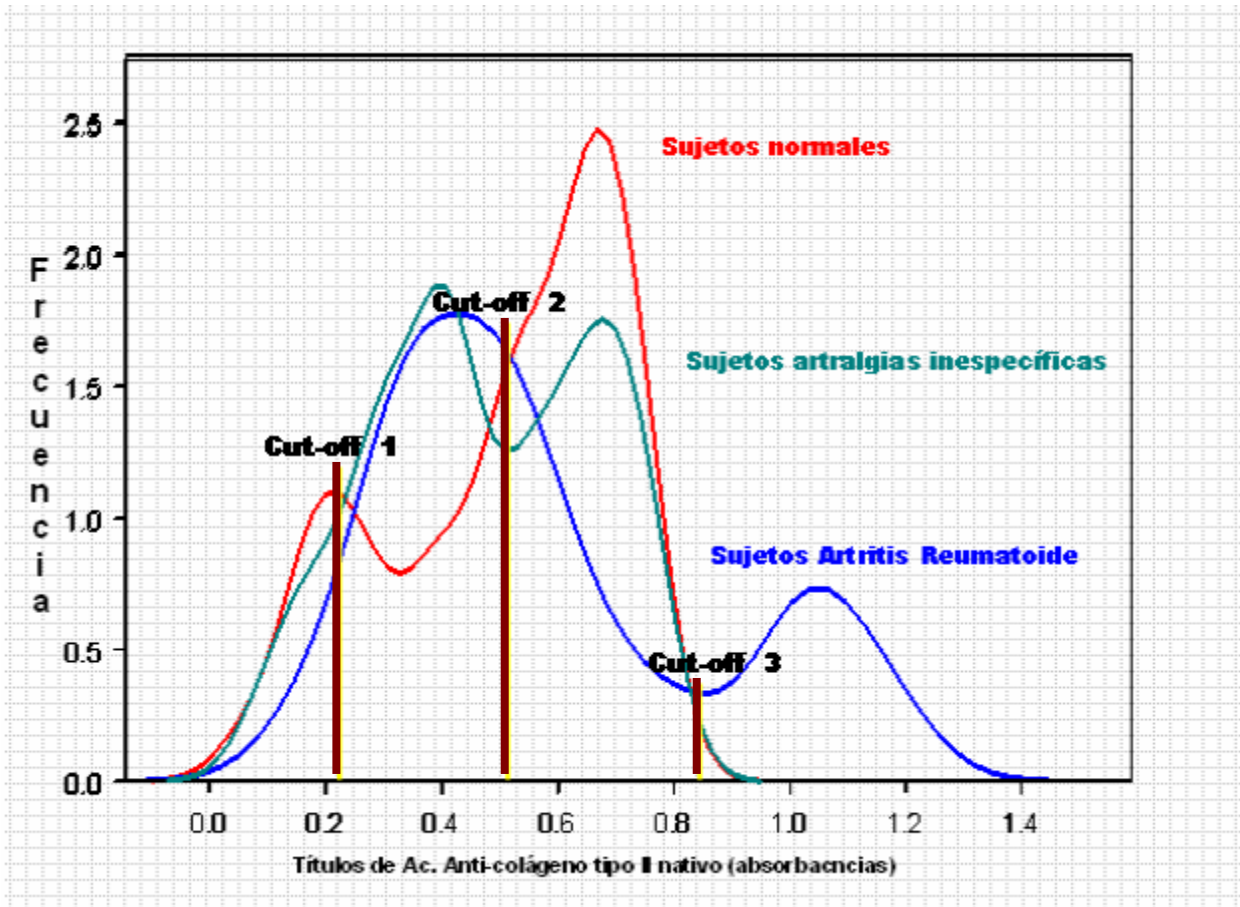


Figura 16. Distribución de frecuencias de los resultados serológicos en los tres grupos de estudio. El título de los cortes (Cut-off) está marcado con una línea café. Es puede observar que algunos grupos (modos) comparten su ubicación entre los tres grupos de estudio.

### **Evaluación de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo como método de diagnóstico.**

El criterio empleado para conocer el valor diagnóstico de una prueba es evaluar su capacidad para distinguir una población enferma de otra población no enferma. Este criterio es especialmente valioso en las enfermedades infecciosas. En el caso de las enfermedades Autoinmunes, se presentan dificultades por la imposibilidad de definir a la población normal. Las gráficas descritas antes muestran este hecho. No obstante lo anterior, la figura 16 donde se muestra la distribución en todos los grupos, se asignaron varios puntos de corte (Cut-off). El primer punto de corte es de 0.22 D.O., el segundo punto de corte es de 0.52 D.O. y el tercer punto de corte es de 0.84 D.O. El primero corresponde al punto de intersección entre el pico más bajo de los sujetos normales con los picos más bajos de los sujetos con Artritis (Artritis Reumatoide y artralgias inespecíficas). El segundo corresponde al punto de intersección entre los picos de valores bajos de artríticos y los picos altos de los normales y los sujetos con artralgias inespecíficas. El tercero corresponde al punto de intersección entre los picos más altos de los normales y los sujetos con artralgias inespecíficas y el pico de títulos elevados de los sujetos con Artritis Reumatoide.

#### **iv. Determinación de anticuerpos contra tejido sinovial por Inmunofluorescencia Indirecta.**

##### **Estandarización de la prueba de inmunofluorescencia para la determinación de Anticuerpos Anti-membrana sinovial.**

En consideración a que una proporción importante de péptidos cíclicos citrulinizados constituyen parte de la estructura proteica de la membrana sinovial (Vossenaar E. et al, 2003), se estimó la posibilidad de una correlación entre anticuerpos anti-CCP y anticuerpos anti-membrana sinovial. Para determinar este hecho con la suficiente precisión se procedió a optimizar los procedimientos utilizados así como la concentración de bioreactivos.

##### **Estandarización del pegado del tejido al soporte de vidrio (portaobjetos).**

En ensayos preliminares para determinar las diluciones óptimas del suero y del conjugado, se encontró que la muestra se tejido sinovial en la que solo se adicionó Conjugado IgG Fluoresceína anti-IgG humana daba resultados positivos, lo que sugería la presencia de depósitos de IgG en tejido sinovial normal.

Para evitar este hecho se sometió el tejido a lavados con buffer acetato a pH 3.5 y con PBS a pH 7.4 para eliminar la presencia de IgG humanas de depósito, y así evitar falsos positivos. Sin embargo, para lograr lo anterior era preciso fijar el tejido en el portaobjeto sin utilizar calor o fijadores químicos que alteren la estructura de la muestra y por tanto precipiten las inmunoglobulinas en el tejido, evitando su remoción.

En la tabla 5 se aprecia los resultados del uso de diferentes agentes que ayudan al pegado del tejido al portaobjetos, ninguno de los agentes utilizados mostró eficacia para retener el tejido al portaobjetos cuando se efectuaba los lavados; entre las soluciones de lavado, se encuentra que el buffer de acetatos a pH 3.5 es él mas deletéreo en su efecto de despegado del material de vidrio. Ante esto, se optó por emplear el procedimiento físico que consiste en cambio de temperatura de – 20°C (en

el micrótomo) a temperatura ambiente en el exterior y luego se guardó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Esto permitió un óptimo pegado sin el uso de reactivos químicos.

En cuanto al lavado con buffer PBS o Buffer acetato pH 3.5 (para remover la unión de Anticuerpo-Antígeno y así las Inmunoglobulinas fijadas) se encontró que ambos disminuyen la fluorescencia inespecífica por lo que se decidió el uso de PBS que asegura tanto la liberación de Inmunoglobulinas como la preservación de la estructura antigénica.

Tabla 5. Determinación de la sustancia para el mejor pegado del tejido al portaobjetos.

Sustancia.	Numero de lavados.									
	Ninguno		20 lavados		30 lavados		40 lavados		80 lavados	
	BA	PBS	BA	PBS	BA	PBS	BA	PBS	BA	PBS
Ninguna.	√	√	†	√	†	√	†	√	†	†
Ovoalbúmina	√	√	†	‡	†	‡	†	‡	†	†
Goma líquida.	√	√	†	‡	†	‡	†	‡	†	†
Goma Arabiga 50% 25% 10% 5%.	√	√	†	‡	†	‡	†	‡	†	†
	√	√	†	‡	†	‡	†	‡	†	†
	√	√	†	‡	†	‡	†	‡	†	†
	√	√	†	‡	†	‡	†	‡	†	†
Bálsamo de Canadá	√	√	√	√	√	√	√	√	†	†

√ Presencia de tejido, estructura conservada.

† Ausencia de tejido.

‡ Rastros de tejido.

En cuanto al número de lavados que asegura la eliminación de fluorescencia inespecífica se encontró que estos deben ser al menos 40 veces (figura 17).

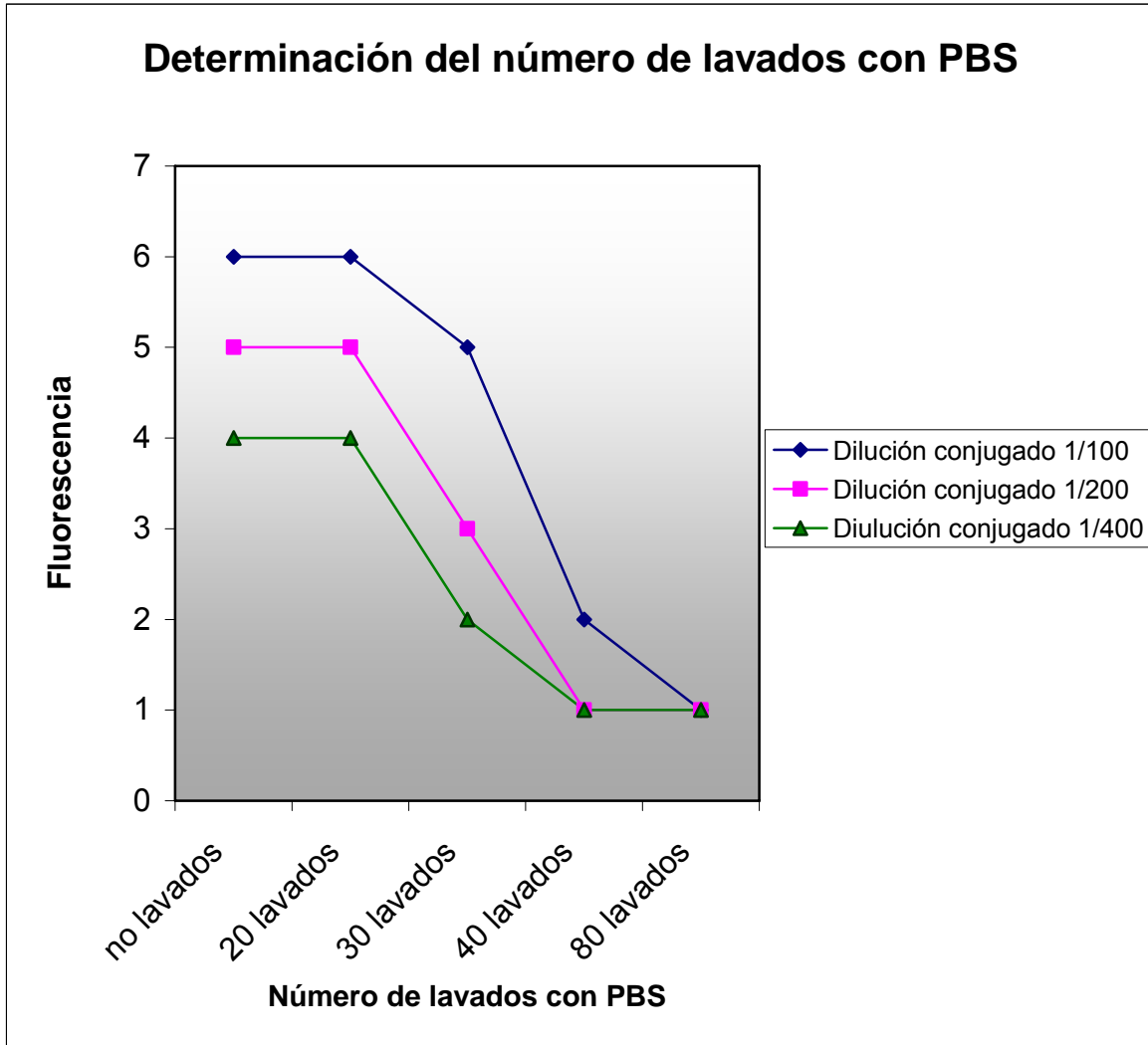


Figura 17. Determinaciones del número de lavados, para la eliminación de fluorescencia inespecífica y remoción de depósitos de IgG en tejido sinovial, para la Inmunofluorescencia. El número de lavados para la eliminación de fluorescencia inespecífica es de 40 veces Los valores de fluorescencia son:

- 1 = Negativo.
- 2 = Rastro.
- 3 = (+) fluorescencia leve.
- 4 = (++) fluorescencia moderada.
- 5 = (+++) fluorescencia elevada.
- 6 = (++++) fluorescencia intensa.

### Determinación de las diluciones adecuadas de suero y de conjugado para determinar la presencia de anticuerpos anti-membrana sinovial.

La figura 18 muestra que la concentración óptima, para la determinación de anticuerpos anti-membrana sinovial, es una dilución de suero de 1:20 (absorbido) y de conjugado 1:200. En estas diluciones no existen indicios de fluorescencia inespecífica que puedan dar resultados falsos positivos.

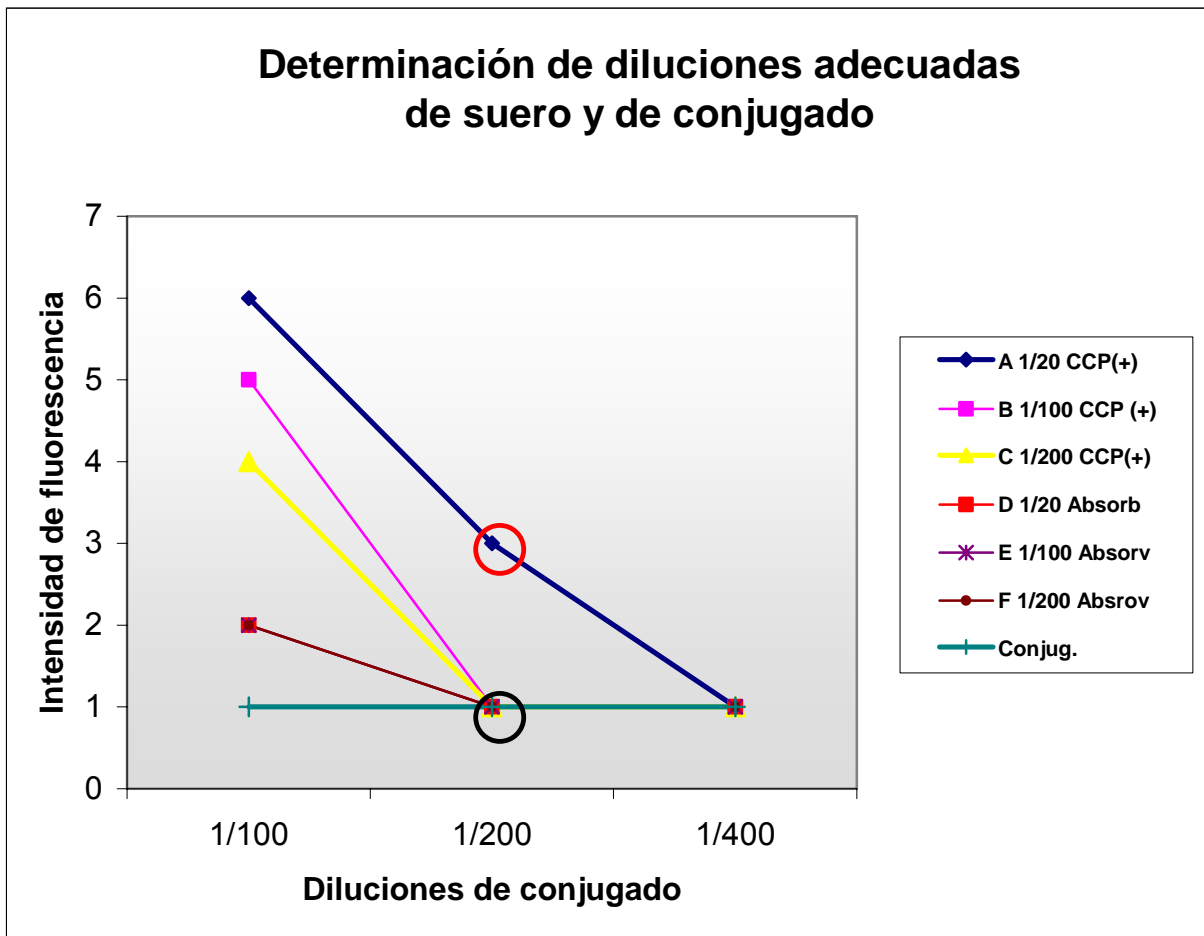


Figura 18. Determinación de las diluciones del conjugado y del suero. Se usaron sueros Anti-CCP (+) como control positivo; como control negativo se usó un pool de sueros absorbidos. La concentración óptima, para la determinación de anticuerpos anti-membrana sinovial, es la dilución de suero de 1:20 y de conjugado 1:200. A la intensidad de fluorescencia se le asignaron los siguientes valores:

- 1 = Negativo.
- 2 = Rastro.
- 3 = (+) fluorescencia leve.
- 4 = (++) fluorescencia moderada.
- 5 = (+++) fluorescencia elevada.
- 6 = (++++) fluorescencia intensa.

### **Determinación de los niveles de anticuerpos anti-membrana sinovial.**

El tejido sinovial es el principal blanco de inflamación en la Artritis Reumatoide; este se expresa como un proceso que es el resultado del depósito de complejos inmunes y que se denomina sinovitis; este proceso es el principal responsable del daño tisular difuso en la articulación. Existe la posibilidad de que además de los fenómenos autoinmunes ya conocidos en la Artritis Reumatoide (IgM Anti-IgG, IgG anti-CCP, IgG anti-colágeno tipo II). El fenómeno inflamatorio induzca a la exposición de autoantígenos, desencadenando una respuesta autoinmune contra estructuras de la membrana sinovial, con la producción de anticuerpos anti-membrana sinovial (hipersensibilidad tipo II) y formación de nuevos complejos inmunes (hipersensibilidad tipo III) los cuales se depositaría en este tejido provocando un proceso inflamatorio que explica el daño sostenido y severo.

Para examinar esta hipótesis de la población total estudiada se separaron al azar 70 muestras (62%) en los cuales se determinó la presencia de anticuerpos anti-membrana sinovial por inmunofluorescencia.

La figura 19 muestra que en los tres grupos existen sujetos con anticuerpos anti-membrana sinovial. Sin embargo, los títulos tienen una distribución amplia, detectándose la existencia de Anticuerpos Anti-membrana sinovial con altos títulos solo en pacientes con Artritis Reumatoide 7/33 (21%), siendo dos personas de este grupo las que presentan la mayor intensidad de fluorescencia (++++), a diferencia del resto de los grupos. Un caso es una Artritis Reumatoide Juvenil con sero-negatividad para anticuerpos anti-CCP y el otro es una Artritis Reumatoide crónica.

En los pacientes con artralgiyas inespecíficas solo 7/26 (27%) presentan anticuerpos anti-membrana sinovial pero en títulos bajos (solo rastros o una cruz).





La figura 20, muestra la curva de frecuencia que expresa la distribución de anticuerpos anti-membrana sinovial en el conjunto de los tres grupos de estudio, este presenta un domo principal que se encuentra cerca de uno, este valor corresponde a valores negativo en la Inmunofluorescencia. Pero se puede observar que existe un lomo pequeño al final que corresponde a pacientes con Artritis Reumatoide, que poseen títulos cualitativamente altos a diferencia del resto de los grupos de estudio. Uno de ellos corresponde a una Artritis Reumatoide juvenil y el otro caso es un Paciente diagnosticado de Artritis Reumatoide que no tiene una característica particular que la diferencie del resto del grupo.

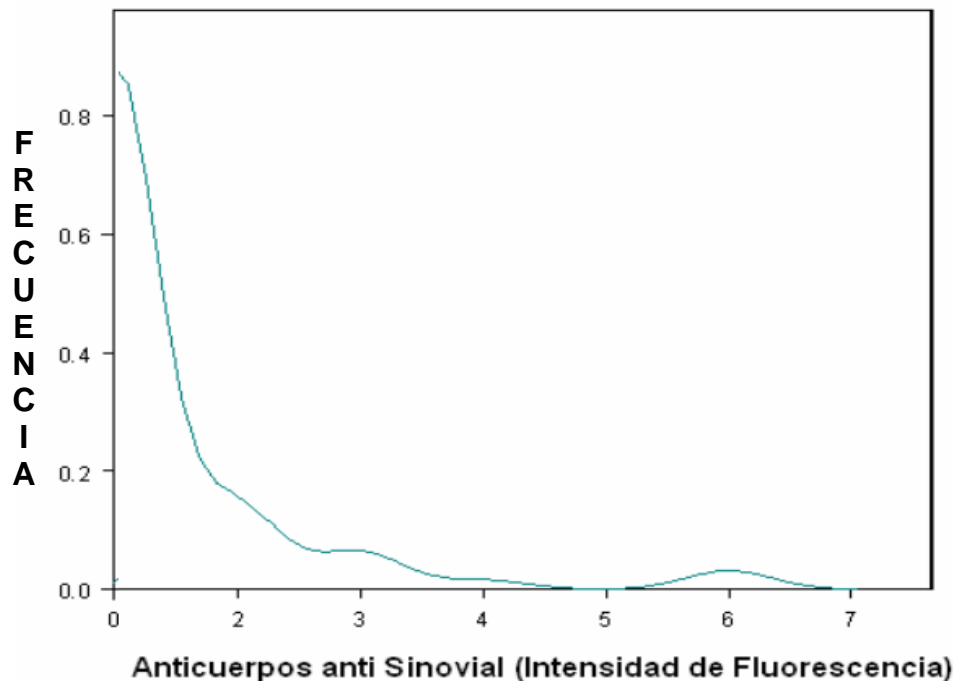


Figura 20. Curva de distribución de Anticuerpos anti-membrana sinovial. Se observa que existe un lomo pequeño al final que corresponde a pacientes con Artritis Reumatoide  
1= Negativo. 2 = Rastro. 3 = (+). 4 = (++) . 5 = (+++) . 6 = (++++).

### Presencia de Anticuerpos contra otras estructuras del tejido sinovial.

En los tres grupos incluyendo los normales, se encontraron casos en los que se observa presencia de fluorescencia en la fibras de colágeno que conforman el tejido sinovial lo que se interpretó como existencia de anticuerpos Anti-colágeno tipo I en el suero. Los tres grupos de estudio presentan un patrón de distribución parecido (Figura 21), aunque en los sujetos normales hay un número menor de sueros positivos (5/12).



Figura 21. Determinación de anticuerpos contra otras estructuras del tejido sinovial (presumiblemente anticuerpos anti-colágeno tipo I) en los tres grupos de estudio, incluyendo a los normales. Los tres grupos de estudio presentan un patrón de distribución parecido.

● Pacientes con Anticuerpos Anti-CCP (+).

● Pacientes con Anticuerpos Anti-CCP (-).

1= Negativo. 2 = Rastros. 3 = (+). 4 = (++) . 5 = (+++) . 6 = (++++).

Por su parte en los tres grupos se encontraron sueros que muestran fluorescencia en la membrana basal capilar, hecho que se interpretó como la posible existencia de sujetos con anticuerpos Anti-elastina. En los tres grupos se encontró el mismo patrón de distribución: existencia de casos con fluorescencia leve; en el grupo con Artritis Reumatoide es 12.5% (4/32), en el grupo de artralgiias inespecíficas 3.8% (1/26).

**v. Niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo y su relación con datos clínicos.**

En la figura 22 se muestra los títulos de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo de sujetos normales en los que se indago sobre el consumo de cartílago en su dieta. En principio se puede observar que la mayoría de la población estudiada consume poca cantidad de cartílago en su dieta 24/41 (58%), muy pocos sujetos consumen una dieta rica en cartílago 5/41 (12%).

Lo anterior parece indicar que la dieta no influye en los títulos de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo, se observa títulos altos tanto en sujetos con una dieta pobre y rica como en aquellos que no consumen cartílago en su dieta.

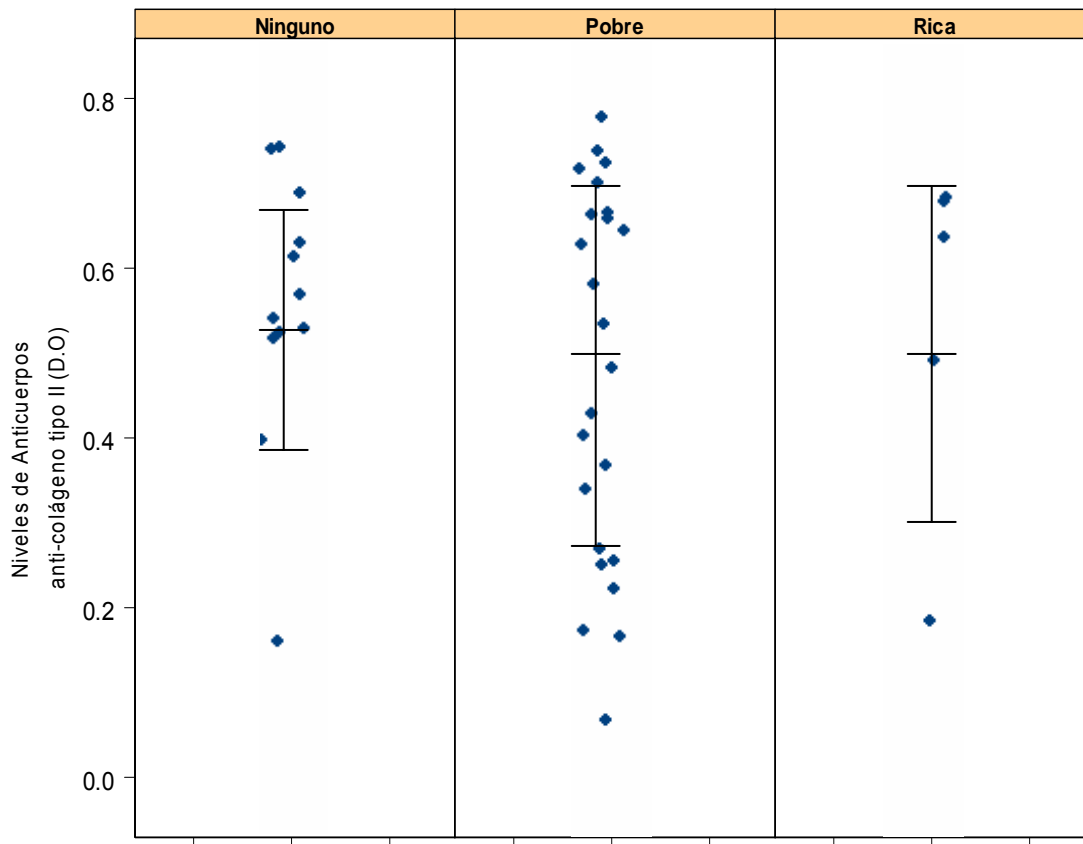


Figura 22. Determinación de anticuerpos anti-colágeno tipo II en sujetos normales que ingieren cartílago dentro de su dieta. Se observa títulos altos tanto en sujetos con una dieta pobre y rica como en aquellos que no consumen cartílago, por lo que no influye en los títulos de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo,

La comparación entre grupos muestra que no existe diferencias estadísticas entre el grupo de sujetos con ingesta rica en cartílago y el grupo sin ingesta de cartílago ( $p > 0.5$ ). La comparación entre el grupo de los que no ingieren cartílago y los que ingieren poca cantidad en la dieta no muestra diferencia estadística ( $p > 0.3$ ), de la misma manera que lo que ocurre entre los sujetos con pobre ingesta de cartílago y los sujetos con rica ingesta de cartílago ( $p > 0.5$ ).

La figura 23 muestra la curva de frecuencia de los títulos de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo en sujetos normales, en los sujetos que tienen ingesta de cartílago dentro de su dieta. Los tres grupos presentan curvas bimodales levemente diferentes en cuanto a amplitud y altura pero no en ubicación en los niveles o títulos de anticuerpos.

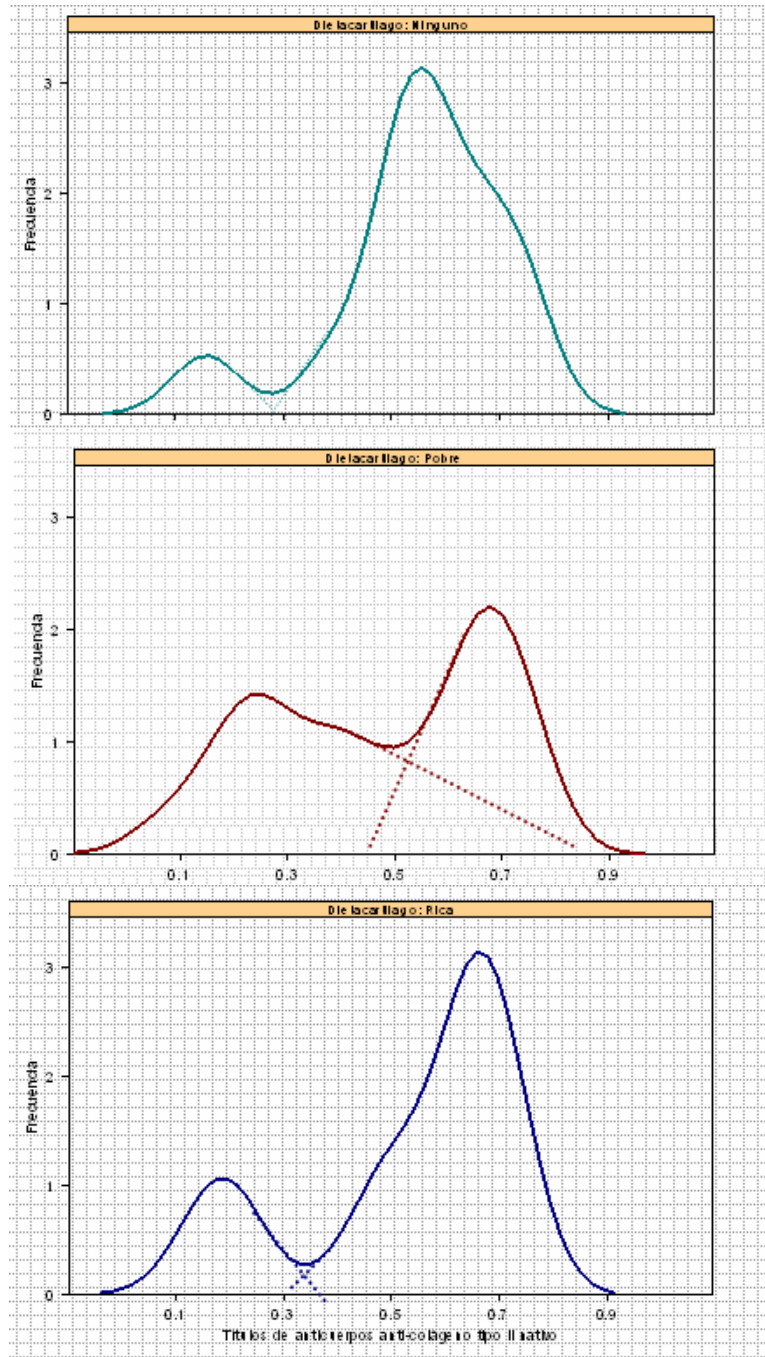


Figura 23. Curva de frecuencias de distribución de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo, en sujetos normales en relación a la ingesta de cartílago dentro de su dieta. Los tres grupos presentan curvas bimodales parecidas.

La comparación entre grupos muestra que no existe diferencias estadísticas entre el grupo de sujetos que recibió tratamiento con *antiinflamatorios* y el grupo de sujetos que no recibieron tratamiento ( $p > 0.5$ ). La comparación entre el grupo de sujetos que recibieron tratamiento con antiinflamatorios y el grupo que recibió tratamiento con inmunosupresores no muestra diferencia estadística ( $p > 0.1$ ), de la misma manera no existe diferencia estadística entre los sujetos que recibieron tratamiento en base a inmunosupresores y entre los sujetos que no recibieron tratamiento ( $p > 0.2$ ) (Figuras 24, 25, 26).

En la figura 24 se muestra la frecuencia en relación al título de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo en el grupo de sujetos que recibieron tratamiento con base a *antiinflamatorios*, se observa una curva bimodal en la que el primer modo presenta una meseta y un segundo modo más pequeño al final, lo que muestra la existencia de un grupo mayor de bajos títulos y otro pequeño de títulos altos.

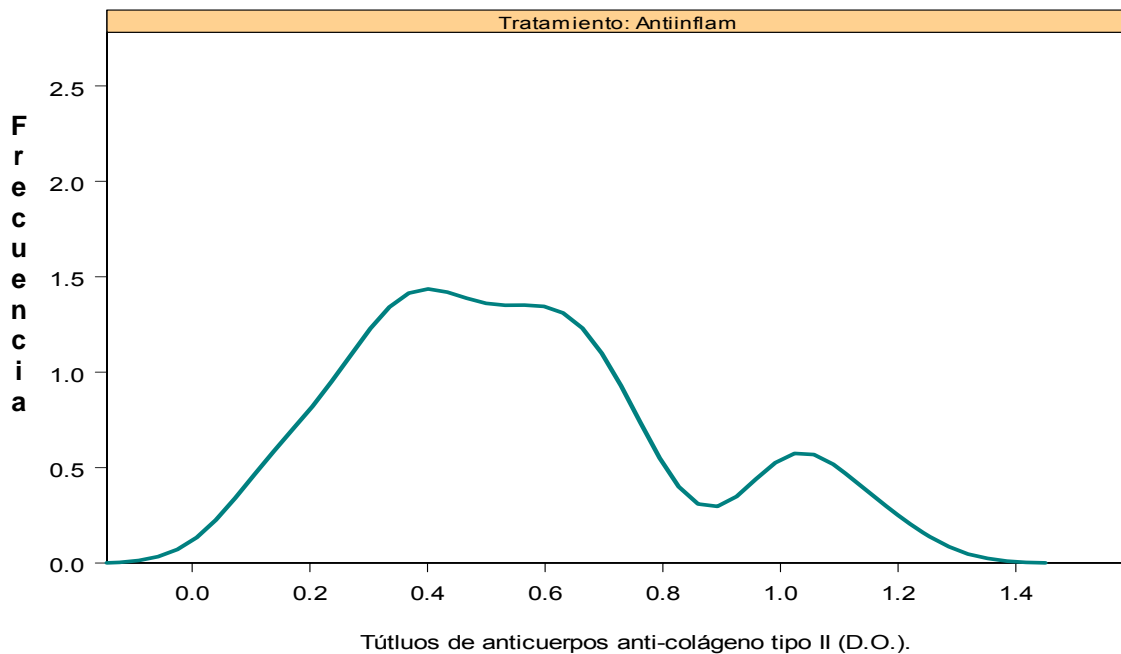


Figura 24. Curva de frecuencia (densidad) de los títulos de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo en sujetos que recibieron tratamiento con antiinflamatorios (AINES más corticosteroides).

Por su parte en los sujetos que recibieron tratamiento con *inmunosupresores* (figura 25) se aprecia la existencia de una sola población de amplia distribución, solo con títulos bajos.

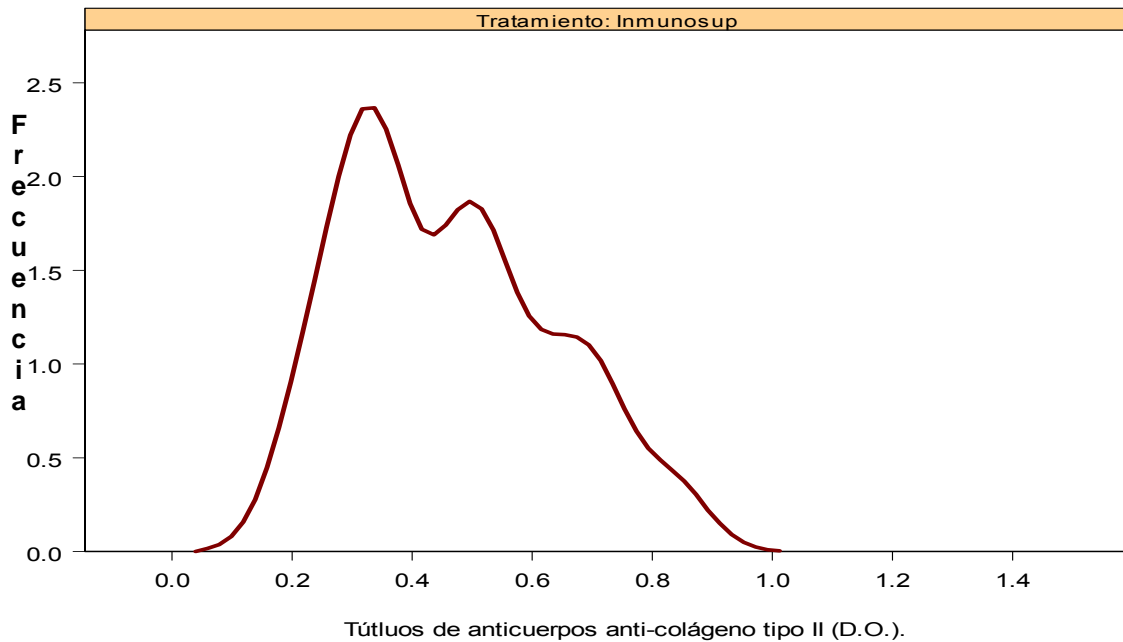


Figura 25. Curva de densidad de los títulos de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo en sujetos que recibieron tratamiento con inmunosupresores (Metrotexato más corticoides).

En el grupo de sujetos que *no recibieron tratamiento* (Figura 26), se observa una curva bimodal, con una distribución similar a la de los sujetos que recibieron tratamiento con antiinflamatorios. Pero el primer modo (títulos bajos) es alto y amplio, no presenta la meseta del grupo con tratamiento antiinflamatorio, también existe un pequeño modo al final que correspondería a los sujetos con títulos altos de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo:

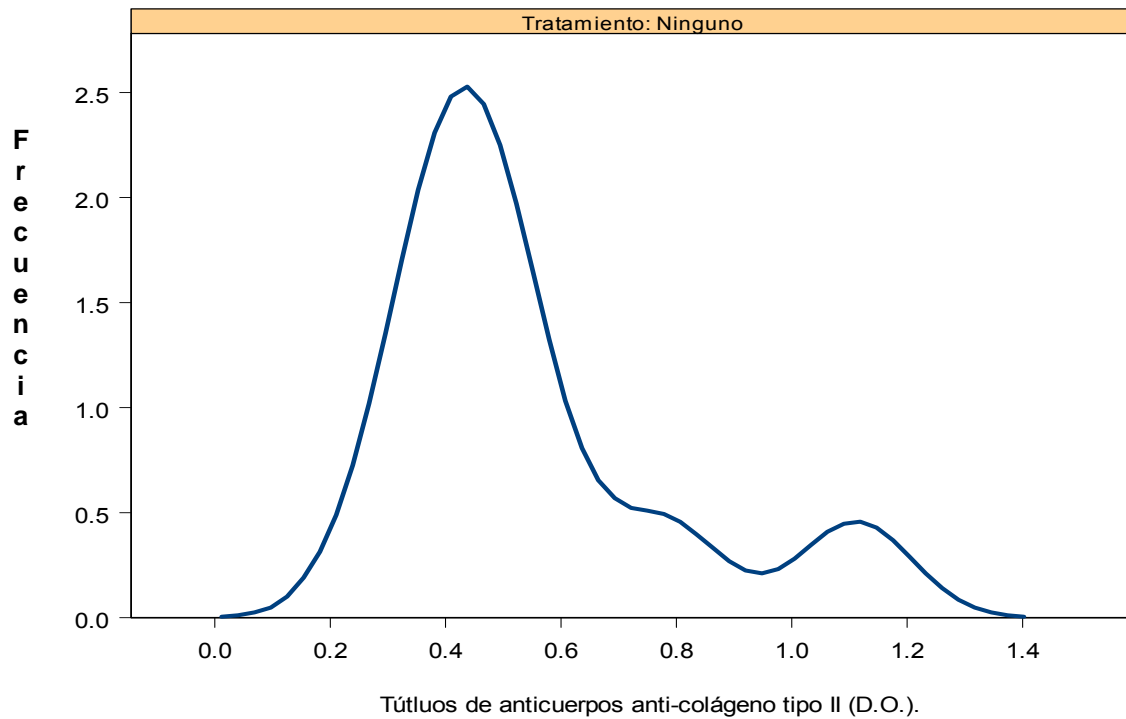


Figura 26. Curva de densidad de los títulos de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo en sujetos que no recibieron tratamiento.

Comparando las curvas de densidad de frecuencia de los tres grupos (Figura 27), se observa importantes diferencias en la distribución, lo que permite definir perfiles en cada grupo según el tratamiento recibido, particularmente es factible diferenciar el grupo con tratamiento inmunosupresor que no tiene el modo de títulos altos, el cual sí se presenta en los otros dos grupos.



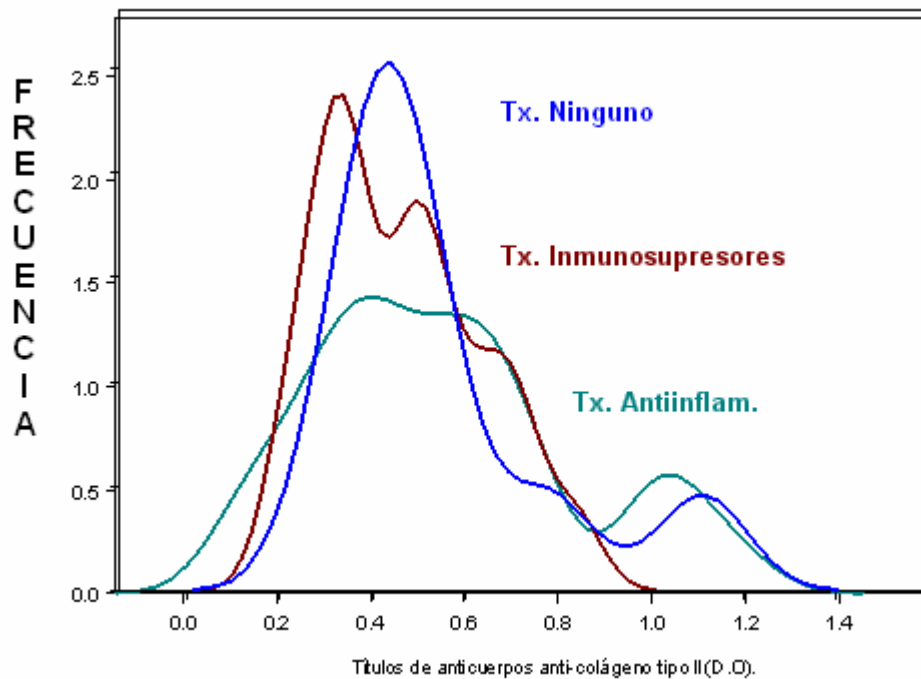


Figura 27. Curva de frecuencias de distribución de anticuerpos anti-colágeno tipo II, en sujetos que recibieron tratamiento con antiinflamatorios, con inmunosupresores o que no recibieron tratamiento.

Comparando las curvas de frecuencia (densidad) de la evolución de los sujetos de estudio (Figura 28), se observa importantes diferencias en la distribución, lo que permite definir perfiles en cada grupo. La curva de distribución de evolución excelente presentan una distribución amplia que incluye un primer modo amplio y alto de títulos bajos, un segundo modo pequeño al final de títulos altos. Esta figura también se puede observar en los sujetos con evolución buena pero algo más acentuada. La curva de distribución del grupo de evolución regular presenta una distribución bimodal simétrica (el primero alrededor de 0.5 D.O. y el segundo alrededor de 1.2).

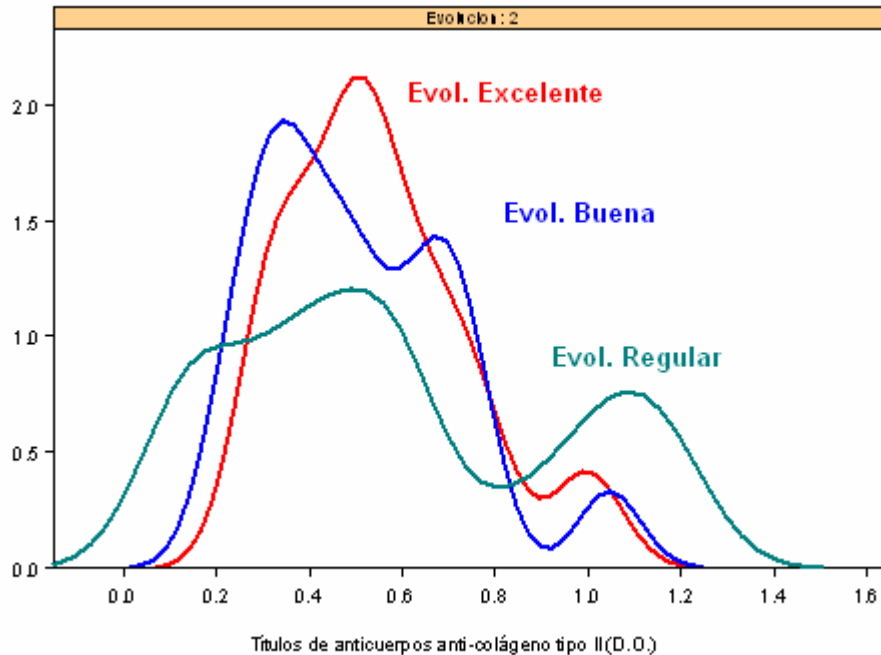


Figura 28 Determinación de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo, en dos grupos de estudio (Artritis Reumatoide y Artralgias inespecíficas) y su relación con la evolución no encontrándose diferencias en los títulos de anti-colágeno tipo II nativo.

#### vi. Correlación entre los niveles de anticuerpos contra diferentes autoantígenos en artropatías.

Tomando en cuenta de que el colágeno puede ser sustrato de citrulinización por la enzima Peptidil arginina deimidasa (Vossenaar E. et al, 2004, 2003), se decidió evaluar la posibilidad de que los sueros de los sujetos con anticuerpos anti-CCP también reconozcan al colágeno como antígeno. Para esto se examinó la correlación entre los niveles de anticuerpos contra ambos antígenos. Se encontró que existe una leve correlación entre los niveles de anticuerpos anti-CCP y Anticuerpos Anti-colágeno tipo II nativo, como se observa en la figura 29. Puede apreciarse también que al menos cuatro sujetos tienen títulos de anticuerpos anti-CCP y anti-colágeno tipo II mayores a una desviación estándar.

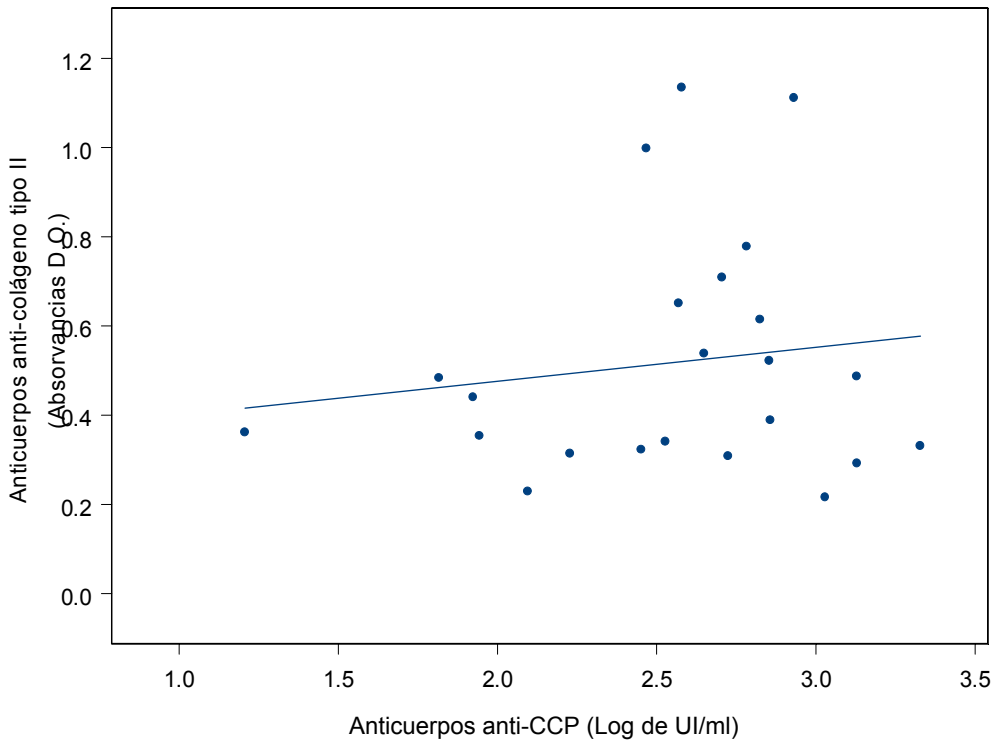


Figura 29. Correlación entre anticuerpos anti-CCP y Anticuerpos Anti-colágeno tipo II nativo.

Igualmente la correlación entre los anticuerpos Anti-CCP y Anticuerpos anti-membrana sinovial es muy leve (Figura 30). Solo tres pacientes presentan anticuerpos anti-CCP y Anti-sinovial positivos. 4 presentan anticuerpos anti-membrana sinovial positivos pero Anticuerpos Anti-CCP negativos; y 12 no presentan anticuerpos anti-membrana sinovial, pero si tienen Anticuerpos Anti-CCP positivos.

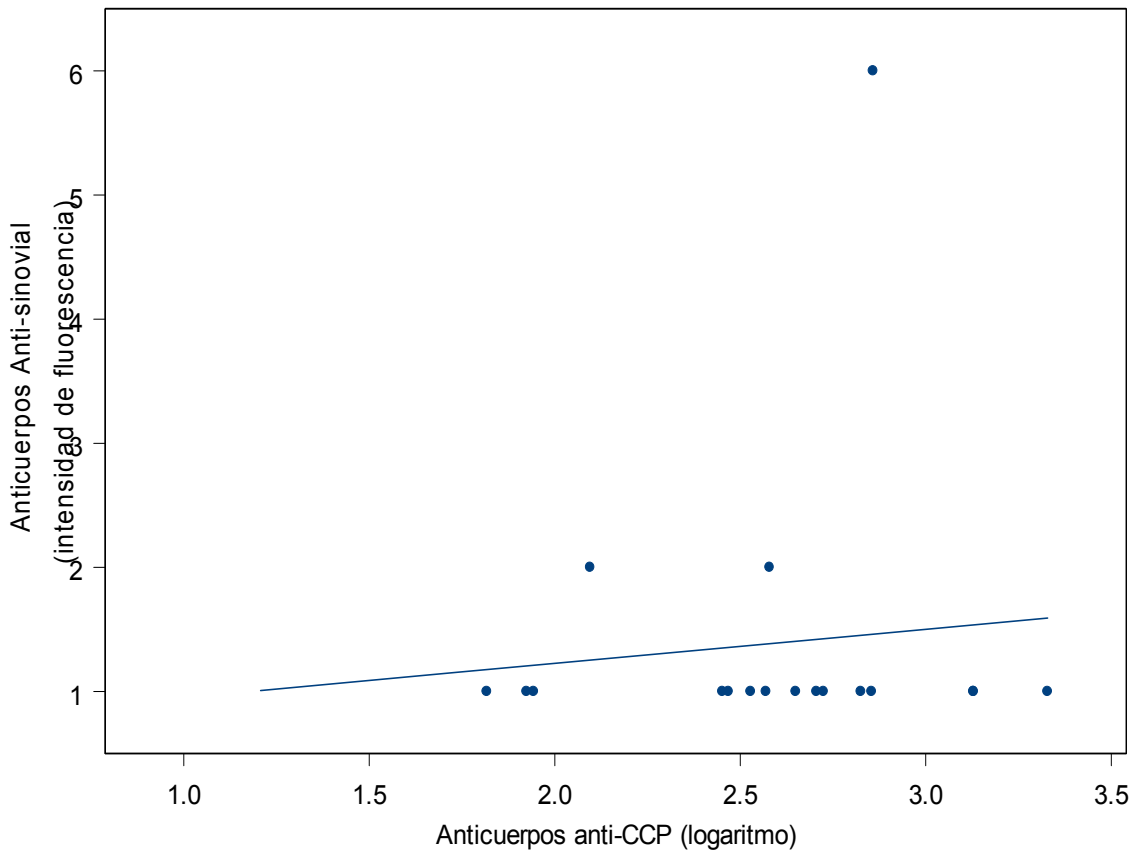


Figura 30. Correlación entre anticuerpos anti-sinovial y anti-CCP.

1= Negativo. 2 = Rastro. 3 = (+). 4 = (++). 5 = (+++). 6 = (++++).

En los referente a la posibilidad de que los anticuerpos anti-CCP reconozcan péptidos citrulinizados en el colágeno tipo I. Se examinó la correlación entre ambos parámetros (Figura 31). Se observó que no existe correlación significativa entre los anticuerpos anti-CCP y Anticuerpos anti-colágeno tipo I, aunque puede observarse una leve tendencia de correlación negativa.

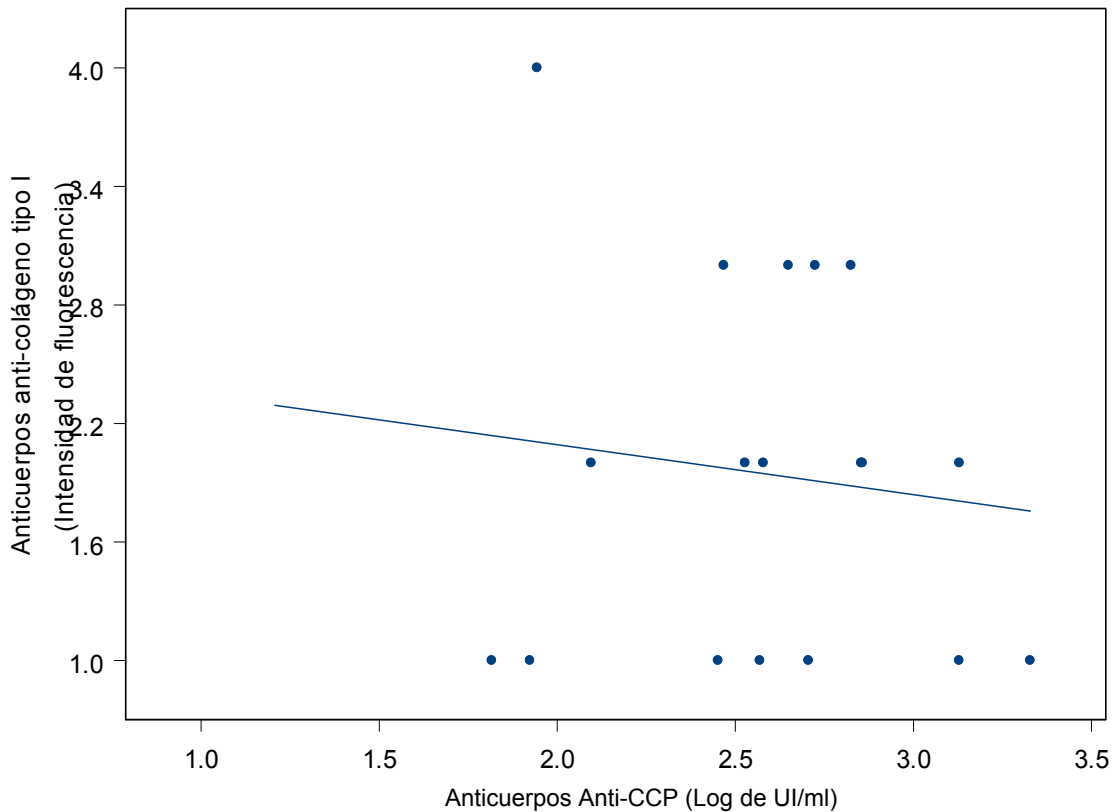


Figura 31. Correlación entre anticuerpos anti-colágeno tipo I y anti-CCP.

1= Negativo. 2 = Rastro. 3 = (+). 4 = (++) . 5 = (+++) . 6 = (++++).

En referencia a la relación de anticuerpos anti-elastina y otros parámetros, el hecho de que los casos positivos se caracterizan por una fluorescencia intensa y no existe casos de sueros con fluorescencia de intensidad intermedia, impide hacer una correlación estadística adecuada. Sin embargo se puede inferir una ausencia de correlación ya que existen sujetos con títulos elevados de anticuerpos anti-CCP que son negativos para anticuerpos anti-sinovial y también existen casos que presentan lo contrario, es decir, sujetos con títulos bajos de anticuerpos anti-CCP y positivo para anticuerpos anti-elastina (Figura 32).

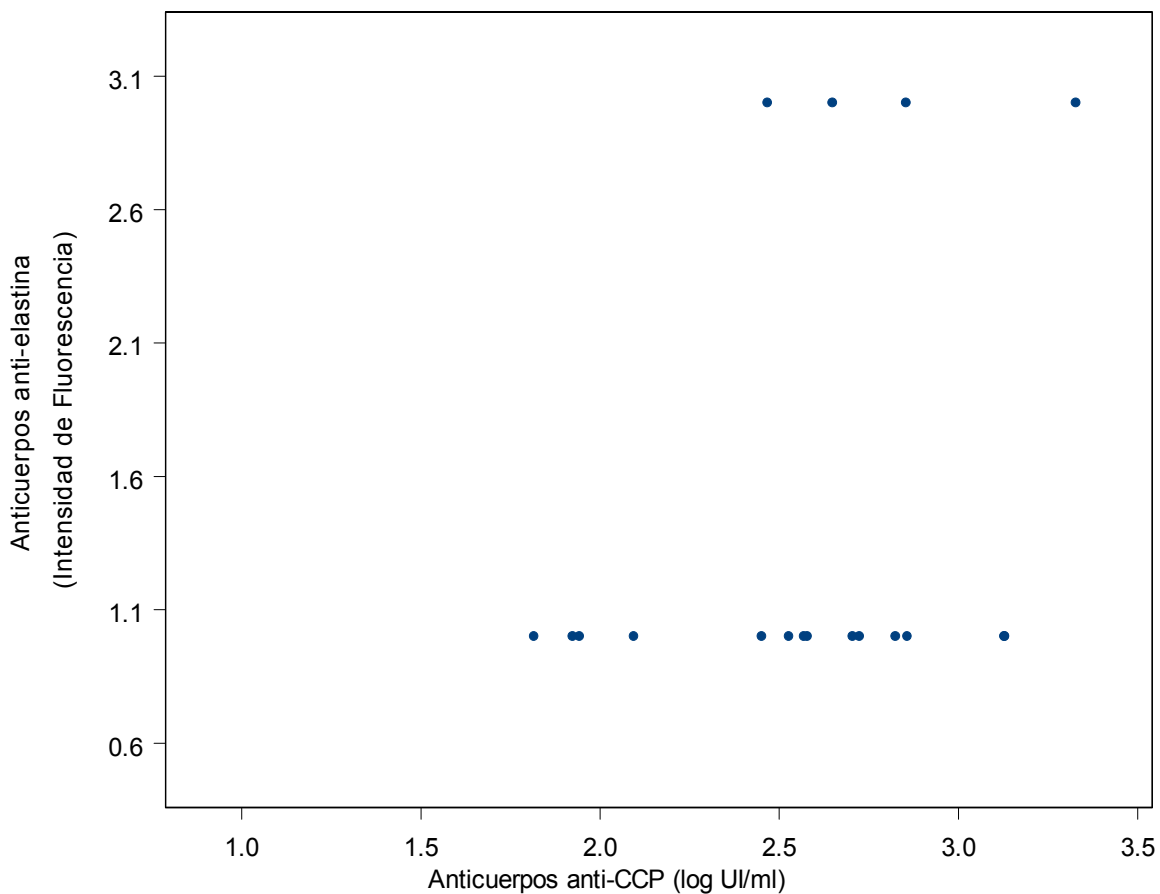


Figura 32. Correlación entre anticuerpos anti-elastina y anti-CCP.

1 = Negativo. 2 = Rastro. 3 = (+). 4 = (++) . 5 = (+++) . 6 = (++++).

Por otra parte se evidenció que no existe correlación significativa entre anticuerpos anti-membrana sinovial y anti-colágeno tipo II (figura 33). Solo se observó una leve tendencia a una correlación negativa.

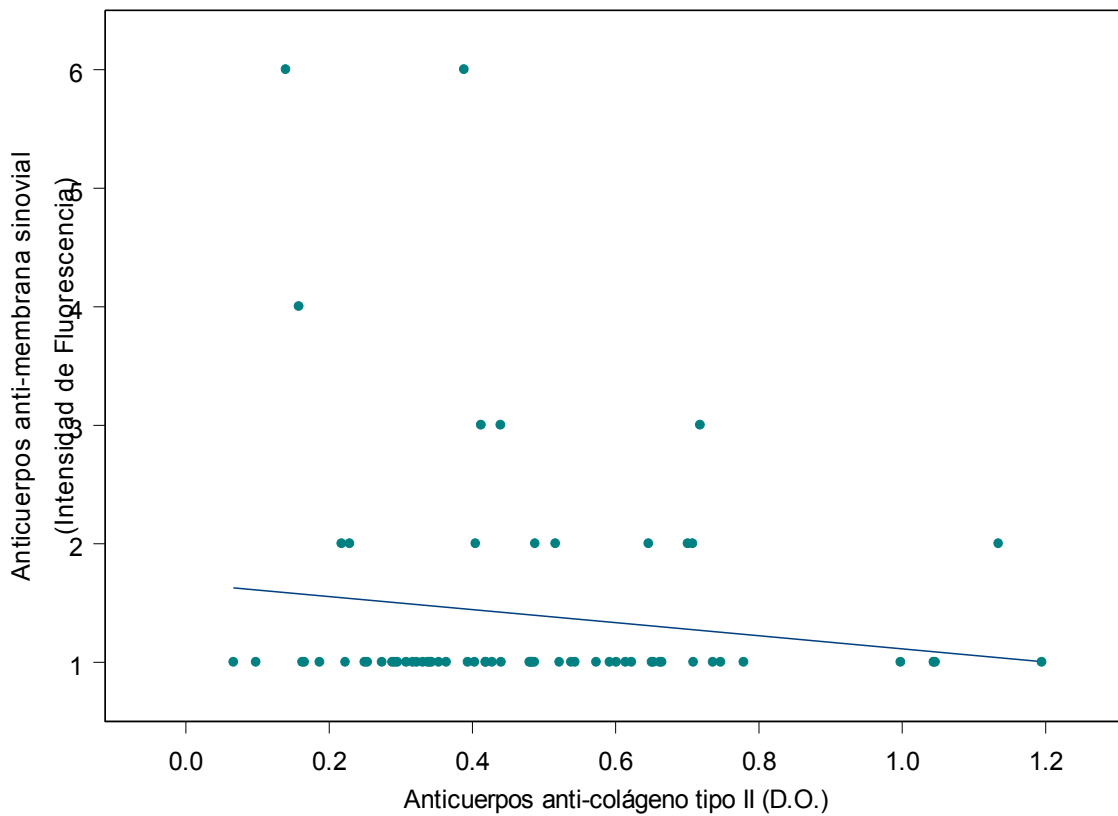


Figura 33. Correlación entre anticuerpos anti-membrana sinovial y Anticuerpos anti-colágeno tipo II.  
1= Negativo. 2 = Rastro. 3 = (+). 4 = (++) . 5 = (+++) . 6 = (++++).

Tampoco existe correlación entre los anticuerpos anti-colágeno tipo I y Tipo II (Figura 34), solo se aprecia una muy leve tendencia negativa, por la existencia de títulos altos de anticuerpos anti-colágeno tipo I en sujetos con títulos bajos de anticuerpos anti-colágeno tipo II.

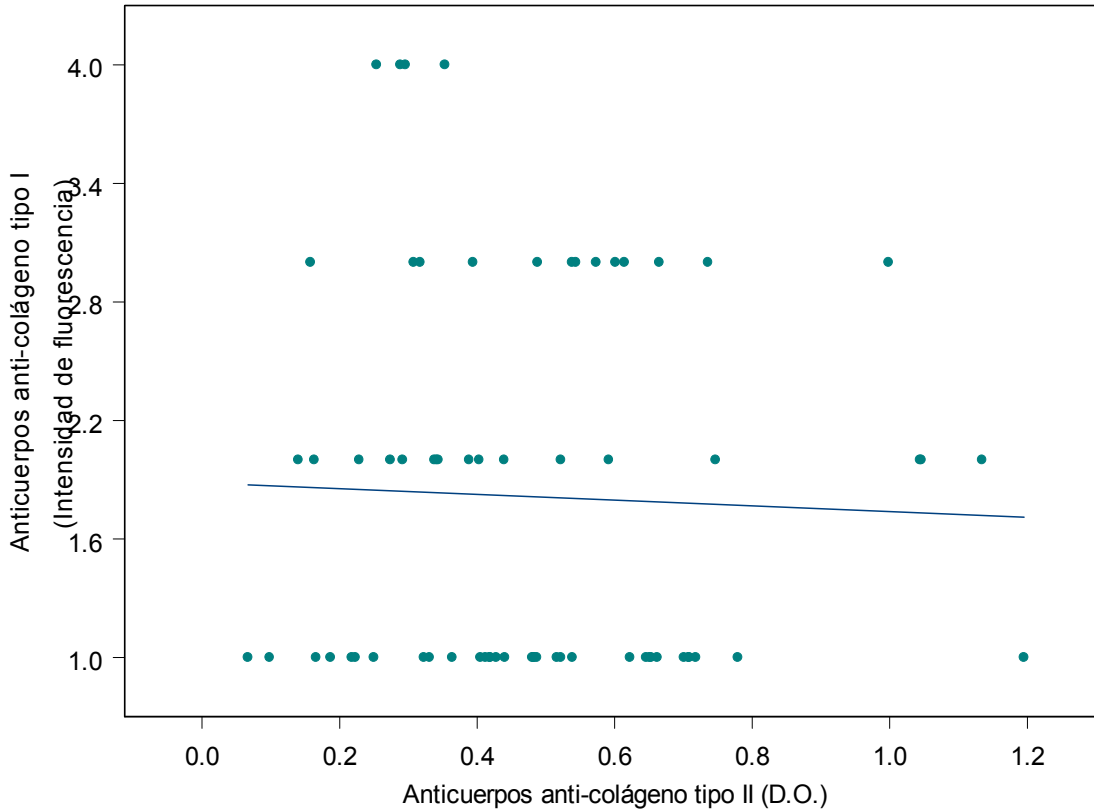


Figura 34. Correlación entre anticuerpos anti-colágeno tipo I y Anticuerpos Anti-colágeno tipo II.  
 1= Negativo. 2 = Rastro. 3 = (+). 4 = (++) . 5 = (+++) . 6 = (++++).



## **VI. DISCUSIÓN.**

Los procesos autoinmunes caracterizados por la afectación del aparato locomotor incluyen, entre sus componentes patogénicos, la existencia de fenómenos fibrosantes de diferente magnitud. Tales fenómenos parecen estar asociados a la existencia de reactantes autoinmunes contra el colágeno y contra otros componentes de los tejidos afectados. En el caso de las artropatías, particularmente la Artritis Reumatoide, este componente autoinmune aún no ha sido dilucidado en toda su magnitud. Sobre la base de los antecedentes que asocian la existencia de anticuerpos contra estructuras en las que participa el colágeno y conduce al daño articular. En este trabajo, se han desarrollado procedimientos, que condujeron a la exploración de la respuesta de anticuerpos contra diferentes autoantígenos de la estructura articular.

Para esto, en principio, se montaron procedimientos de análisis inmunológico que permitieron evaluar los niveles de anticuerpos contra colágeno tipo II nativo y contra otras estructuras articulares. En este orden, se procedió a implementar de manera controlada las técnicas de ELISA e Inmunofluorescencia Indirecta contra colágeno tipo II y contra tejido sinovial, respectivamente.

Se conoce que la determinación de anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinizado (anti-CCP) tiene un importante valor diagnóstico; sobre esta base, se propuso en principio utilizar esta técnica para la selección de los sujetos de estudio. Para la determinación de anticuerpos anti-CCP se uso un Kit comercial\*, el cual estaba estandarizado y validado previamente. No obstante se procedió a su validación en nuestro laboratorio. Los resultados encontrados muestran que este procedimiento es reproducible y alcanza suficiente precisión.

---

\* Los reactivos para la determinación de anticuerpos anti-CCP utilizados corresponden a la primera generación (Nº catálogo RA 96-RT, Euro-Diagnóstica), los anti-CCP de segunda generación no fueron utilizados en este trabajo en vista de que un número significativo de pacientes ya habían sido estudiados con el primer tipo de reactivo, para lograr un numero representativo de sujetos que permita un análisis estadístico adecuado se continuo utilizando los reactivos de primera generación.

Varios estudios muestran una importante especificidad de los anticuerpos Anti-CCP para el diagnóstico de Artritis Reumatoide; esta es mayor a 89% según Simón M. et al (1993), Schellekens GA. et al (1998), Goldbach-Mansky R. et al (2000), Schellekens GA. et al (2000), Bizzaro N. et al (2001), Suzuki K. et al (2003), Rantapää-Dahlqvist S. et al (2003), Van Gaalen F. et al (2004), Lundberg K. et al (2005) y Van der Helm – van Mil A. et al (2005).

Este hecho se da, no obstante que, existen otras patologías inflamatorias de naturaleza similar (Avouac J. et al, 2006) y que en muchas ocasiones involucran a los tejidos articulares, ya que la citrulinización es un fenómeno dependiente de la existencia de enzimas que se expresan como efecto de la existencia de señales inflamatorias (TNF  $\alpha$ , IL-1) y que se regula por la presencia de estrógenos (lo que explicaría la mayor incidencia de estos anticuerpos en mujeres).

En cambio la sensibilidad, tiene una variación mayor y va desde el 33,7% al 87,6% según diferentes autores (Simón M. et al, 1993; Schellekens GA. et al, 1998; Goldbach-Mansky R. et al, 2000; Schellekens GA. et al, 2000; Bizzarro N. et al, 2001; Rantapra-Dahlqvist S. et al, 2003; Suzuki K. et al, 2003). En nuestro trabajo hemos encontrado que de los pacientes que presentaban signosintomatología propia de la artritis reumatoide, según los criterios del American College of Rheumatology, solo el 50% dieron resultados positivos para este biomarcador (títulos mayores a 25 UI/ml). Estos resultados son similares a los de Raza K. et al, 2005 quienes encuentran también el 50%.

Por lo anterior, todos lo sujetos anti-CCP positivos fueron incorporados en el grupo de Artritis Reumatoide (compatibles o no con los criterios del American College of Rheumatology) en este sentido según, este criterio, los sujetos con artritis inespecíficas y los testigos normales fueron siempre negativos. Los niveles de anticuerpos anti-CCP en artríticos, expresados como UI/ml \* (montos equivalentes al título de anticuerpos anti-CCP), mostraron una amplia dispersión ( $X=329.68$  UI/ml; rango 0–2130 UI/ml;  $DE=477,85$  UI/ml), estos datos incluyen a 18 sujetos con anti-CCP negativo (dos sujetos con 16 UI/ml y dos sujetos 4 UI/ml; el resto = 0 UI/ml).

---

\* Kit comercial Euro-Diagnostica.

Si excluimos los sujetos que dieron = 0, el promedio es 597,4 UI/ml, el rango es 65.6 – 2130 UI/ml y la DE es 507,1 IU/ml lo que muestra una variación importante; esta diferencia de valores a primera vista parece no tener un significado claro; sin embargo, si se examina cuidadosamente la distribución de los niveles a lo largo del rango se observa un importante agrupamiento alrededor de 329 UI/ml y solo algunos casos alcanzan valores significativamente altos. Tal es el caso de una paciente con Artritis reumatoide con títulos extremadamente elevados (2130 UI/ml), los cuales se mantienen no obstante estar recibiendo tratamiento inmunosupresor.

Esto podría indicar que el nivel de anticuerpos no correlaciona con la diferente reactividad tisular. En este orden, se conoce que los anticuerpos anti-CCP se presenta en niveles elevados en periodos tempranos de la enfermedad, sin embargo, en nuestro trabajo hemos encontrado sujetos que mantienen títulos altos, no obstante cursar en fases tardías y con tratamiento inmunosupresor.

En la pretensión de indagar sobre la naturaleza de la reactividad contra el colágeno tipo II (articular) la parte central de este trabajo consiste en la evaluación de la respuesta inmunológica contra este autoanticuerpo (Kim W. et al, 2000), en sujetos con Artritis Reumatoide, en comparación con sujetos con artralgias inespecíficas y con sujetos normales, Para esto se montó y estandarizó la técnica detección de anticuerpos séricos contra colágeno tipo II nativo. El procedimiento se inició con la obtención de cartílago nasal de buey y su preparación como bioreactivo para realizar un ensayo inmunoenzimático. El procedimiento utilizado, y ya validado ampliamente (Weir M. et al, 1996) mostró adecuada eficacia y alto rendimiento. Asimismo, el manejo y dosificación fue altamente reproducible. De todos modos, se procedió a obtener en una ocasión un monto elevado (lote), que permita la utilización del mismo bioreactivo en todas las pruebas utilizadas.

Para la detección de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo, fue necesario estandarizar el procedimiento inmunoenzimático de modo que se pueda trabajar en las óptimas condiciones para lograr la reproducibilidad y la linealidad que asegure la confiabilidad de los resultados. Los aspectos que debieron normalizarse fueron

aquellos relacionados a la concentración de los reactantes, particularmente el conjugado IgG de Cabra, anti-Fc de IgG humana, acoplada a peroxidasa de rábano; la concentración de suero a ser utilizado y la preparación del suero control negativo. Para esto se realizaron pruebas con diferentes concentraciones (diluciones semilogarítmicas) de los dos primeros reactantes. Los datos obtenidos fueron procesados en matrices de concentración de datos y se logró conocer las diluciones óptimas, las cuales se utilizaron a lo largo de todo el trabajo. Es importante apuntar que las concentraciones encontradas están en el mismo orden de magnitud que las reportadas por diferentes autores (Burkhardt H. et al, 2006; Mullazehi M. et al, 2007).

Para contar con un adecuado control negativo, fue necesario preparar un suero exento de anticuerpos puesto que la posibilidad de encontrar sueros negativos (reactividad = 0) en sujetos sanos no era suficientemente alta. Evidentemente, resultados preliminares nos mostraron que el suero de gran parte de personas aparentemente sanas, reaccionan en ensayos inmunoenzimáticos, con el colágeno tipo II en diferentes niveles (la significancia de este hecho se discute mas adelante). En este orden la preparación del control negativo fue efectuada a partir de sueros negativos para anticuerpos anti-CCP de sujetos normales, los cuales fueron absorbidos con colágeno tipo II nativo, incubando el pool de sueros en condiciones de cultivo por diferentes tiempos (12 y 24 horas), en placas multipozos a las que se adhirió este bioreactivo. Con este procedimiento se obtuvieron sueros con títulos anti-colágeno tipo II significativamente bajos; sin embargo, nunca pudo lograrse valores iguales a cero. Asumimos que este hecho puede deberse a la existencia de interacciones inespecíficas entre el colágeno tipo II y las inmunoglobulinas séricas. Es posible que por esta causa otros autores utilicen como control negativo una solución de Albúmina Sérica Bovina (BSA); sin embargo, estimamos que este compuesto no reúne todas las condiciones fisicoquímicas que otorga el suero para que se reproduzca adecuadamente la reacción antígeno-anticuerpo.

Con estas condiciones se procedió a medir los niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo (reportado en Unidades de Densidad Óptica U.D.O.) en sujetos con Artritis Reumatoide, en sujetos con artralgias inespecíficas y en sujetos normales. Fue interesante encontrar que en las tres poblaciones existían sueros positivos y

negativos, aunque los primeros se encontraban en mayor proporción en los artríticos. La distribución de los resultados era aparentemente similar en los tres grupos (el promedio en sujetos con Artritis Reumatoide es de  $0.577 \pm 0.288$  D.O.; de los sujetos con artralgiás inespecíficas es de  $0.473 \pm 0.192$  D.O.; de los sujetos normales de  $0.506 \pm 0.199$  D.O). Lo anterior parecía en principio indicar que los niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II y su presencia no guardaban relación con los procesos articulares autoinmunes, al menos con los reportados en este trabajo. Sin embargo, una observación cuidadosa de la distribución de estos datos en lo referente al título, mostró que solo en el grupo de los sujetos con Artritis reumatoide existían sujetos con altos títulos, los cuales sobrepasaban las dos desviaciones estándar del promedio de los sujetos normales. Este hecho estaba ausente en los sujetos con artralgiás inespecíficas. Lo anterior permitió poner en evidencia que los niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II se agrupaban alrededor de ciertos valores, tanto en los sueros de sujetos reumáticos como en los sujetos con artralgiás inespecífica. Para poner en evidencia este hecho, se elaboraron curvas de frecuencia según el procedimiento de Kerner\*. En principio se trazo una curva de distribución de frecuencias que incluía a los tres grupos en conjunto. Se pudo observar una gran curva de tipo gausseano con un pico máximo al rededor de 0.6 U.D.O. y otro pico menor alrededor de 1.04, este último, interesantemente, correspondía exclusivamente a los sujetos con artritis reumatoide de alto título.

Para evidenciar las diferencias entre los tres grupos se trazaron curvas para cada uno de ellos, lo cual permitió observar lo siguiente (figura 16):

Los sujetos normales mostraron una distribución bimodal que consistía en un modo pequeño de títulos bajos (pico alrededor de 0.2) y un modo más amplio y alto de títulos mayores (intermedios alrededor de 0.66). Este hecho sugería la existencia de dos poblaciones de las cuales la primera pareciera corresponder a los sujetos enteramente sanos por la ausencia de reactividad para colágeno tipo II, y la segunda curva a los sujetos que no tienen expresión clínica pero pudieran tener reactividad detectable en el suero; de hecho, la anamnesis de estos sujetos reporta que precisamente en estos casos existía artralgiás eventuales asociadas con episodios de enfriamiento de las extremidades (“humedad o frío ambiental extremo”).

---

\*Paquete estadístico SPSS, versión 12.0.

En el caso de los sujetos con artritis reumatoide, también se encontró una curva bimodal cuyo primer modo está alrededor de 0.441 D.O. y el segundo modo alrededor de 1.014 D.O.; analizando estadísticamente ambos modos eran significativamente diferentes ( $p < 0.001$ ). Lo anterior mostraba la existencia de dos poblaciones evidentemente distintas: la que reportaba alto título y la de título menor, esta última en los mismos niveles del modo mayor de los sujetos normales. El mismo tratamiento estadístico para los sueros de sujetos con artralgias inespecíficas mostró también una curva bimodal cuyos picos estaban alrededor de 0.4 y 0.68 D.O.; el primer modo tenía un máximo con ubicación similar al del primer modo de los sujetos con Artritis Reumatoide, el otro modo de títulos mayores era muy similar al segundo modo de los sujetos normales (Figura 16).

En resumen, en el conjunto de los sujetos estudiados se encontró: un pico de títulos muy *bajos*, alrededor de 0.2 D.O., solo observable en el grupo de los sujetos normales; otro pico *intermedio*, alrededor de 0.441 D.O. que se encontraba en sujetos con Artritis reumatoide y sujetos con artralgias inespecíficas, un pico mayor que corresponde a los títulos elevados de los sujetos normales y los que padecen artralgias inespecíficas y por último un pico de niveles muy elevados correspondiente solo a los reumáticos (Figura 16).

Lo anterior puede interpretarse como la existencia de poblaciones con diferentes títulos entre las cuales destaca el hecho de que el grupo de sujetos normales y el de los que tienen artralgias inespecíficas existen casos con títulos altos pero en ningún caso con títulos iguales o mayores a los del grupo extremadamente elevado existente entre los sujetos con Artritis Reumatoide. Esta población (inexistente en el grupo de Artritis Reumatoide) pudiera ser el reflejo de la existencia de sujetos *predispuestos* que, obviamente, ya no se los visualiza en el grupo de los sujetos con Artritis Reumatoide. De la misma forma, en los sujetos con Artritis Reumatoide y sujetos con Artralgias Inespecíficas existe un pico intermedio que no se hace evidente en los sujetos normales y que pudiera significar la existencia de una población con la patología *en curso* en la que cantidades importantes de anticuerpos se encuentran depositados en el sitio de afectación, lo que explicaría la disminución de su título en suero.

El último pico, el más elevado que aparece exclusivamente en los sujetos con Artritis Reumatoide, parece ser una característica propia de ciertos sujetos con alta reactividad artrítogénica. Interesantemente, se pudo encontrar que estos sujetos correspondían a aquellos en cuya evolución y tratamiento no se incluye el manejo de fármacos inmunosupresores; en otras palabras, todo indica que los sujetos con Artritis Reumatoide que no reciben esquemas terapéuticos con inmunosupresores muestran este perfil de altos títulos de anticuerpos anti-colágeno tipo II. Esto, por tanto, sugiere que los sujetos incorporados en el pico de títulos intermedios (sujetos con artritis reumatoide) son precisamente aquellos que han recibido tratamiento inmunosupresor y que por tanto no se les permitió tener títulos elevados o que si los tuvieron retornaron a los niveles intermedios, pero en ningún caso a la normalidad. En el caso de los sujetos con algún tratamiento (AINES, corticosteroides o inmunosupresores) estos muestran un perfil muy definido, no obstante que dichos sujetos tenían diferente antigüedad en el tratamiento. De hecho, el tiempo de tratamiento no fue una variable examinada en este trabajo por las dificultades que significa la obtención de este dato.

La elaboración de curvas de frecuencia en relación al título de anticuerpos, tienen en la inmunología una importante utilidad diagnóstica. Esto es particularmente importante en las *enfermedades infecciosas*, en las que los sujetos normales o no infectados (sin presencia microbiana en el medio interno), no forman anticuerpos y si estos existen están en niveles bajos que se expresan en una curva de frecuencia con un pico en títulos “dentro de lo normal”; la población de sujetos que tienen presencia microbiana activa y, por tanto, han formado anticuerpos séricos, expresa títulos elevados que configuran una curva cuyo pico esta alejado del pico de los sujetos normales (MacMaster 1983; Riegelman AK. et al, 1991). El punto de intersección (depresión) de estos picos se denomina *cut-off* y permite separar a ambas poblaciones, aunque también debe considerarse la existencia de una franja de incertidumbre en la que se incluyen sujetos que teniendo la enfermedad infecciosa tienen títulos similares al de los sujetos normales y también sujetos normales o que ya no cursan con la enfermedad que tienen títulos relativamente elevados. Con esta base teórica se buscó examinar si las curvas de frecuencia de los títulos de anticuerpos anti-colágeno tipo II

podrían ser útiles para diferenciar poblaciones de sujetos que cursan o no con la patología autoinmune en estudio. Como puede observarse en los resultados, es evidente la imposibilidad de trazar un *cut-off* que permita distinguir los sujetos con el padecimiento de los sujetos sanos ya que se encontraron curvas bimodales tanto en los sujetos aparentemente sanos como en los que padecían artropatías. Sin embargo, en este trabajo se planteo la posibilidad de sobreponer las curvas de las tres poblaciones y establecer “varios *cut-off*” en las depresiones observables (figura 16). Un primer *cut-off* se ubica alrededor de 0.22 D.O, este diferenciaría los sujetos sanos (“normales”) de los sujetos que tienen predisposición a desarrollar procesos autoinmunes. Otro *cut-off* (segundo) podría ubicarse alrededor de 0.51 D.O. que permite diferenciar entre los sueros con títulos intermedios de los de títulos elevados, estableciendo separación entre sujetos predispuestos y los sujetos que cursan con la patología. Un tercer *cut-off* a nivel de 0.84 D.O. que diferencia entre los sujetos que cursan con la enfermedad autoinmune de aquellos cuya reactividad autoinmunitaria mediada por anticuerpos anti-colágeno tipo II es muy alta y traduce la ausencia de procesos de inmunomodulación ya sean naturales (del propio organismo) o inducidos por fármacos (inmunosupresores). Pero considerando el levado grado de solapamiento entre las muestras de Artritis Reumatoide, artralgiás inespecíficas y normales, la cantidad de falsos positivos o falsos negativos esperable será extremadamente elevada por lo que el ensayo sería de utilidad diagnóstica relativa.

La presencia de efectores autoinmunes contra otras estructuras de los tejidos articulares ha sido planteada por diferentes autores (Mackay I. et al, 2004), particularmente en modelos experimentales (Cho Y, et al 2007). En patología humana no se ha reportado fehacientemente la presencia de este tipo de anticuerpos o células T, siendo mas bien de importancia destacada los complejos inmunes contra otras moléculas, los cuales se depositarían en la sinovial articular en el marco del mecanismo de la Hipersensibilidad tipo III: el tejido viene a ser un “blanco inocente”. Los antígenos que generan los complejos circulantes, que se depositan en la articulación pueden ser tanto de origen endógeno (IgG, DNA, etc) como exógenos (estructuras virales o bacterianas) (Kamradt T. et al, 1991; Klinman DM. et al, 1996; Perron H. et al, 1997; Tough DF. et al, 1997; Horwitz MS. et al, 1998; Cella M. et al,



1999; Abbas A. 2002; Infante-Duarte C. et al, 2000; Gourley M. et al, 2007). En el caso presente se propuso la búsqueda de anticuerpos contra otras estructuras articulares por Inmunofluorescencia Indirecta en los sueros de sujetos artríticos, de sujetos con artralgias inespecíficas y de sujetos normales.

Para esto fue importante estandarizar los procedimientos, en la intención de lograr resultados que eviten, en lo posible, la aparición de falsos positivos y falsos negativos. Uno de los puntos críticos consistió en superar las dificultades que conlleva el hecho de trabajar en tejidos humanos puesto que, se sabe, existen inmunoglobulinas que están presente en cualquier tejido, como efecto del traslado de estas moléculas del suero a los tejidos aun cuando fuese en cantidades mínimas (trasudación fisiológica); estas inmunoglobulinas al reaccionar con el conjugado fluoresceína Ig anti-IgG humana produciría fluorescencia inespecífica. Para evitar esto, en los estudios utilizados para explorar autoinmunidad se usa habitualmente tejidos animales (modelos experimentales); sin embargo, en el caso presente fue de interés examinar la reactividad contra estructuras homólogas para eludir la posibilidad de que los autoanticuerpos no reconozcan epítopes que no son parte constitutiva de la estructura de los tejidos articulares heterólogos y si de las estructuras moleculares humanas – lo que explicaría, en parte, la escasez de reportes sobre la existencia de anticuerpos séricos contra sinovial y otras estructuras articulares, ya que en general estos se detectan utilizando tejidos animales.

Para lograr lo anterior (trabajar con tejido homólogo) fue necesario implementar procedimientos que eliminen las inmunoglobulinas de los tejidos, por la evidente posibilidad, de que estas al reaccionar con el conjugado (anti-IgG humana marcada con isotiocianato de fluoresceína) generen resultados falsos positivos o, como ya se dijo, abundante inmunofluorescencia inespecífica. Para lograr este propósito se ensayaron técnicas de lavado del tejido que incluían la utilización de un Buffer ácido (acetatos, pH 3.5) para remover inmunoglobulinas particularmente aquellos anticuerpos que pudieran estar reaccionando (reacción antígeno-anticuerpo) con alguna estructura tisular. También se busco efectuar procedimientos de lavado de los cortes sobre el sustrato de vidrio sin que el tejido haya sufrido procesos de fijación químicos o físicos (solventes, formaldehído, calor) para evitar que las

inmunoglobulinas se precipiten y no puedan ser removidas aquellas cuya presencia en el tejido es incidental o que, por otro lado, se alteren los epítopes de las estructuras proteicas que se pretende detectar con los anticuerpos séricos. Los múltiples ensayos realizados, nos mostraron que es posible fijar los tejidos al sustrato de vidrio (portaobjetos) sin utilizar agentes físicos o químicos (pegamento o fijadores): en este caso se logró este propósito solamente aprovechando el cambio de temperatura: de congelación (-20°C) a Temperatura Ambiente, lo cual permite que el tejido no se desprende con los sucesivos lavados. Por otra parte, se pudo también encontrar que es posible realizar la remoción de los anticuerpos inespecíficos con un buffer neutro (PBS, pH 7.4) sin acudir al buffer ácido (pH 3.5, que favorece el desprendimiento del tejido del portaobjetos), ya que en los resultados preliminares se encontró que el lavado con PBS elimina inmunofluorescencia inespecífica de manera satisfactoria.

También fue importante conocer, la concentración óptima del conjugado a ser utilizado. Para esto se trabajó con diferentes concentraciones de modo que se alcance aquella que no genere inmunofluorescencia inespecífica por alta concentración del reactante, ni genere falsos negativos por ausencia de una concentración crítica. La concentración encontrada después de realizar varios ensayos y después satisfactoriamente utilizada fue de 1:400. También se procedió a determinar la concentración óptima del suero a ser examinando; para esto se utilizaron otros ensayos con diferentes concentraciones y se utilizó un suero control negativo, cuya preparación fue llevada a cabo con absorciones sucesivas en presencia de fragmentos de tejido sinovial e incubaciones a temperatura ambiente y agitación constante. Con este suero control, que estaba exento de anticuerpos que dieran fluorescencia inespecífica, se realizaron los experimentos que dieron lugar a la determinación de la concentración óptima de suero y de conjugado.

Los resultados de la investigación de autoanticuerpos por inmunofluorescencia indirecta muestran que tanto en los grupos de sujetos con artritis reumatoide como en sujetos con artralgiás inespecíficas y los sujetos normales, se presentan casos con evidente inmunofluorescencia positiva para algunas estructuras. Sin embargo, estas son más evidentes y se presentan en mayor número en sujetos con Artritis Reumatoide (21%). No contamos con una explicación clara sobre la existencia de

casos de anticuerpos anti-membrana sinovial, presumiblemente anti-colágeno tipo I y anti-elastina en algunos casos de sujetos normales y, excluyendo la posibilidad de fallas procedimentales, solo queda proponer la existencia eventual de fenómenos autoinmunes sin daño tisular en sujetos aparentemente normales. La significación de esto para la emergencia de procesos de daño posterior, y patología evidente solo podrá conocerse con estudios longitudinales (de cohorte) a lo largo de varios años.

Conociendo el hecho de que la tolerancia oral regula la respuesta inmune humoral a través de la activación de las células T reguladoras, varios autores han explorado esta perspectiva en procesos autoinmunes como en el caso de la Artritis Reumatoide ((Weiner HL. et al, 1994; Xiao BG. et al, 1997; Krause I. et al, 1999) mediante la administración de colágeno tipo II por vía oral para inducir la tolerancia periférica (Trentham DE. et al, 1993; Sieper J, et al 1996; Barnett M. et al, 1998). Ante este hecho se exploró la posibilidad que la dieta rica en cartílago que contiene elevada proporción de colágeno tipo II) pudiera incidir en los títulos de anticuerpos anti-colágeno tipo II en la población de sujetos normales. Los resultados muestran que tanto el grupo con ingesta rica en colágeno tipo II, el grupo de sujetos con ingesta escasa y el grupo que no ingiere cartílago presentan perfiles de frecuencia parecidos, no encontrándose diferencias claras entre los grupos. En los tres existe una distribución bimodal donde se aprecia un pico pequeño con títulos bajos y un pico mayor con títulos elevados. Estos datos sugieren que la ingesta de cartílago o de colágeno tipo II no tiene relación con la respuesta inmune humoral anti-colágeno tipo II y, por tanto, la perspectiva de este tipo de terapia parece no ser tan promisorio como lo mencionan algunos autores. Lo anterior esta en concordancia con los resultados de Trentham DE. et al, 1993; Sieper J. et al, 1996 y Barnett ML. et al, 1998, quienes afirman que los niveles de anticuepos anti-colágeno tipo II no se modifican con la ingesta de este antígeno.

En referencia al mecanismo de acción de ciertos fármacos, especialmente los inmunosupresores y corticoides, en la disminución de la producción de anticuerpos por inhibición de las células B productoras (Parslow T. 2001), se exploró la relación entre la terapia utilizada en los pacientes estudiados y los niveles de anticuerpos anti-

colágeno tipo II. Los resultados obtenidos muestran que, en las curvas de frecuencia en relación a los títulos, existen diferencias en los tres grupos de estudio. En los pacientes que recibieron AINES y corticosteroides, se observa una curva bimodal, donde el primer modo amplio y relativamente elevado incorpora a la mayor parte de los sujetos con títulos bajos o intermedios y un modo pequeño al final con títulos altos, que por el perfil mostrado parece ser un grupo diferente del anterior ( $p < 0.001$ ). En los sujetos sin tratamiento se observa también una curva bimodal, en el que el primer modo es amplio y más agudo, e incorpora a la mayor parte de los sujetos con títulos bajos o intermedios y un modo pequeño al final con títulos altos que, por el perfil mostrado, parece ser también un grupo diferente del anterior.

Interesantemente el grupo con tratamiento inmunosupresor presenta una curva unimodal de distribución gausseana; no existe el modo de títulos elevados. Es importante notar que el modo de títulos elevados que se aprecia en los sujetos sin tratamiento o con antiinflamatorios esta comprendido exclusivamente por sujetos con Artritis Reumatoide.

Lo anterior muestra, con bastante claridad que, como se dijo al inicio, el perfil de distribución de anticuerpos anti-colágeno tipo II tiene características distributivas muy evidentes que asocian los altos títulos al grupo de sujetos que no recibe tratamiento inmunosupresor; por el contrario, los que si lo reciben se incorporan en la subpoblación de títulos bajos.

La significancia clínica y etiopatogénica de los anticuerpos anti-colágeno tipo II aún no esta completamente dilucidada; un intento por aclarar este aspecto fue realizado en este trabajo al examinar el perfil de distribución de frecuencia de los niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II en relación con la evolución del proceso. La figura 28 muestra que los perfiles en cada caso son relativamente diferentes. Así, los sujetos con evolución “excelente” muestran una distribución muy amplia que incluye un pico mayor de bajos títulos y un pico pequeño con altos títulos. Esta figura se repite algo mas acentuada en sujetos con evolución “buena”; este perfil se modifica en los sujetos con evolución “regular” donde se aprecia una franca distribución bimodal simétrica en la que se aumenta el número de sujetos en el pico de títulos altos; (los sujetos con evolución “mala” no están en números significativos por lo que no han sido

considerados en este análisis). Lo anterior sugiere que existe una relación directa entre títulos altos y daño tisular o pobre respuesta al tratamiento. Este hecho puede indicar que en el trasfondo de la dinámica de la respuesta inmune, unos sujetos están migrando de un grupo a otro, dinámica que a su vez, como se sabe, es altamente dependiente de factores externos como la terapia, condiciones ambientales, estrés, infecciones asociadas, etc.

También se realizaron análisis estadísticos para determinar la correlación (asociación) entre los diferentes autoanticuerpos medidos en este trabajo. Se pudo determinar que no existe correlación entre los niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II y los niveles de anticuerpos anti-CCP, por lo que se puede decir que el epítipo citrulinizado no está presente en el colágeno, o que los epítopes del colágeno que reconoce los anticuerpos de los sujetos estudiados en general no son citrulinizados. En los pocos casos en los que los anticuerpos Anti-CCP y Anti-colágeno tipo II nativo son positivos se puede pensar que en estos sueros existen anticuerpos contra epítopes en el colágeno y contra péptidos cíclicos citrulinizados y que ambos sean reconocidos por este suero y que tal hecho sea el desencadenante del proceso de hipersensibilidad tipo II, característico de la Artritis Reumatoide.

En los casos de pacientes con artralgiás inespecíficas (todos anti-CCP negativo, pero anti-colágeno tipo II positivo) puede que se trate de epítopes diferentes que pueden mediar la hipersensibilidad tipo II, que, si bien causan lesión, no se traduce en el cuadro clínico típico de la Artritis Reumatoide, y que, por tanto, no generan las señales inflamatorias a los que conducen los títulos altos de Anticuerpos Anti-CCP.

No existe correlación entre niveles de anticuerpos anti-membrana sinovial y anticuerpos anti-CCP, pero existen casos que son positivos para ambos, lo que puede ser explicado por la posibilidad de que proteínas de la membrana sinovial sufran procesos de citrulinización y sean los autoantígenos responsables del proceso inflamatorio. En el resto de los sujetos es probable que sea otro el epítipo responsable de la reacción inflamatoria en la membrana sinovial.

En cuanto a la correlación entre los anticuerpos anti-colágeno tipo I y anticuerpos anti-CCP, se vio que existen casos que son anti-colágeno tipo I y anti-CCP positivos, se puede pensar que es en estos en los que el colágeno tipo I sufre el proceso de citrulinización; el resto reconoce otros epítopes que no son citrulinizados.

En la correlación de anticuerpos anti-CCP y el patrón de reactividad por inmunofluorescencia corresponde a algo que podría ser compatible contra elastina, se puede reflejar la posibilidad de que al menos en algunos sujetos los epítopes citrulinizados estén en la elastina, lo que sugiere que la elastina estaría involucrada en la posibilidad de convertirse en un sustrato para el proceso de citrulinización de proteínas.

En relación a la asociación entre anticuerpos anti-colágeno tipo II y con anticuerpos anti-membrana sinovial, se puede observar una correlación levemente negativa, así como entre los niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II y anticuerpos anti-colágeno tipo I. Esto puede sugerir que presumiblemente sean epítopes diferentes los que estén participando en estas moléculas para desarrollar el proceso inflamatorio en la Artritis Reumatoide.

## **VII. CONCLUSIÓN.**

El sistema inmunoenzimático de detección de anticuerpos utilizado (ELISA) y la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta otorgan la suficiente garantía de precisión y de reproducibilidad para realizar estudios como el de determinar el perfil de los anticuerpos en procesos reumatológicos.

Los estudios realizados permiten concluir que:

- Los niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo en los tres grupos estudiados incluyendo los normales, presentan curvas de distribución bimodal, pero los perfiles de dichas curvas son totalmente diferente entre ellos: en los sujetos normales existe un pico de títulos bajos y otro de títulos altos, en los sujetos con artralgias inespecíficas existe un pico de títulos intermedios y otro de títulos altos y en los sujetos con Artritis Reumatoide existe un pico con títulos intermedios y otro de niveles "muy elevados". El grupo de sujetos que constituye la curva de los niveles muy elevados de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo en Artritis Reumatoide, esta conformado solo por los individuos que no reciben tratamiento inmunosupresor.
- No existe correlación entre estos marcadores con los anticuerpos anti-CCP con los anticuerpos anti-membrana sinovial y con la ingesta de cartílago.
- Por tanto, los niveles elevados de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo, parecen constituir un predictor temprano de la instalación y la evolución de la Artritis Reumatoide, en sujetos con artralgias y en la población normal.

## **VIII. RECOMENDACIONES.**

Conociendo que la respuesta inmune en los procesos autoinmunes tiene componentes de Respuesta de Hipersensibilidad tipo IV, corresponde complementar el estudio con pruebas de Respuesta Inmune Celular contra este Antígeno. En nuestro laboratorio se inicio este proceso y se encuentra en fase de estandarización (Andersson M. et al, 1990; Andersson M. et al, 1991).

Además, es necesario realizar un estudio de cohorte de los diferentes grupos de estudio para conocer, de manera mas clara, el papel de los anticuerpos anti-colágeno tipo II en la inmunopatología de la Artritis reumatoide y en las perspectivas para su uso como marcador predictivo o de efectividad terapéutica.



**IX. BIBLIOGRAFIA.**

1. Abbas Abul. Cellular and Molecular Immunology. 4º edición, Editorial Saunders. 2002.
2. Albani S, Keystone EC, Nelson JL, Ollier WE, La Cava A, Montemayor AC. (1995). Positive selection in autoimmunity: abnormal immune responses to a bacterial dnaJ antigenic determinant in patients with early rheumatoid arthritis. *Nat Med*;1: 448–52.
3. Alegre ML, Shiels H, Thompson CB, Gajewski TF. (1998). Expression and function of CTLA-4 in Th1 and Th2 cells. *J Immunol*; 161:3347–56.
4. Amirahmadi SF, Pho MH, Gray RE, Crombie DE, Whittingham SF, Biurrun Zuasti B. (2004). An arthritogenic monoclonal antibody to type II collagen, CII-C1, impairs cartilage formation by cultured chondrocytes. *Immunol Cell Biol*; 82.
5. Anderson I. (2001). The properties of hyaluronan and its role in wound healing *Prof Nurse*, 17: 232 – 235.
6. Andersson M., Holmdahi R. Analysis of type II collagen – reactive T cells in the mouse. I. (1990). Different regulation of autoreactive vs non autoreactive anti – type II collagen T cells en the DBA/1 mouse. *J. Immunology* 20: 1061.
7. Andersson M., Cremer MA., Terato K., Burkhardi H., Holmdahi R. Analysis of type II collagen reactive T cells in the mouse. II. (1991). Different localization of immunodominant T cell epitopes on heterologous and autologous type II collagen. *Scand J. Immunol.* 33: 505.
8. Andre I. Gonzalez A, Wang B, Katz J, Benoist C, Mathis D. (1996). Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 2260–2263
9. Arita K, Shimizu T, Hashimoto H, Hidaka Y, Yamada M, Sato M. (2006). Structural basis for histone N-terminal recognition by human peptidylarginine deiminase 4. *PNAS*. April 4. vol. 103. no. 14.
10. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA. (1988). The ACR 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*; 31:315-24.
11. Atamas SP, White B. (2003) Cytokine regulation of pulmonary fibrosis in scleroderma. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 537–550.

12. Avila JJ, Lympny PA, Pantelidis P, Welsh KI, Black CM, Du Bois RM. (1999). Fibronectin gene polymorphism associated with fibrosing alveolitis in systemic sclerosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 20:106–12.
13. Avoac J, Gossec L, Dougados M. (2006). Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann Rheum Dis* ; 65:845–851.
14. Balomenos D, Martín-Caballero J, García MI, Prieto I, Flores JM, Serrano M, Martínez-A C. (2000). The cell-cycle inhibitor p21 controls T-cell proliferation and sex-linked lupus development. *Nature Med.* 6, 171–176.
15. Banchereau J, Steinman RM. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. Mar 19; 392 (6673):245-52.
16. Barnett ML, Kremer JM, St Clair EW, Clegg DO, Furst D, Weisman M, Fletcher MJ, Chasan-Taber S, Finger E, Morales A, Le CH, Trentham DE. (1998). Treatment of rheumatoid arthritis with oral type II collagen. Results of a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* Feb; 41(2):290-7. Erratum in: *Arthritis Rheum* 1998 May; 41(5):938.
17. Becker KG. (1999). Comparative genetics of type 1 diabetes and autoimmune disease: common loci, common pathways? *Diabetes*; 48:1353-8.
18. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of *FOXP3*. *Nature Genet.* 27, 20–21.
19. Birk OS, Elias D, Weiss AS, Rosen A, van-der Zee R, Walker MD. (1996). NOD mouse diabetes: the ubiquitous mouse hsp60 is a beta-cell target antigen of autoimmune T cells. *J Autoimmun*; 9:159–66.
20. Bizzaro N, Mazzanti G, Tonutti E, Villalta D, Tozzoli R. (2001). Diagnostic accuracy of the anti-citrulline antibody assay for rheumatoid arthritis. *Clin Chem.* 2001 Jun;47(6):1089-93. Erratum in: *Clin Chem.* Sep; 47(9):1748.
21. Bonfoco E, Stuart PM, Brunner T, Lin T, Griffith TS, Gao Y, Nakajima H, Henkart PA, Ferguson TA, Green DR. (1998). Inducible nonlymphoid expression of Fas ligand is responsible for superantigen-induced peripheral deletion of T cells. *Immunity* 9, 711–720.
22. Bonsack A. (2006). Modulación de la respuesta autoinmune experimental por *Savia de Musa Paradisiaca (SMp)*. Tesis de grado. Facultad de Bioquímica-SELADIS.

23. Borlado LR, Redondo C, Alvarez B, Jimenez C, Criado LM, Flores J, Marcos MA, Martinez-A C, Balomenos D, Carrera AC. (2000). Increased phosphoinositide 3-kinase activity induces a lymphoproliferative disorder and contributes to tumor generation *in vivo*. *FASEB J.* 14, 895–903.
24. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. (2001). Disruption of a new forkhead/wingedhelix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the *scurfy* mouse. *Nature Genet.* 27, 68–73.
25. Buer J, Lanoue A, Franzke A, Garcia C, von Boehmer H, Sarukhan A. (1998). Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized *in vivo*. *J Exp Med*; 187:177-83.
26. Burkhardt H, Koller T, EngstrfmA, Nandakumar KS, Turnay J, Kraetsh HG, (2002). Epitope specific recognition of Type II collagen by rheumatoid arthritis antibodies is shared by recognition by antibodies that are arthritogenic in collagen induced arthritis in the mouse. *Arthritis Rheum* 46:2339–48.
27. Burkhardt H, Hu"ffmeier U, Spriewald B, Bo"hm B, Rau R, Kallert S, Engstro"m A, Holmdahl R, Reis A. (2006). Association Between Protein Tyrosine Phosphatase 22 Variant R620W in Conjunction With the HLA–DRB1 Shared Epitope and Humoral Autoimmunity to an Immunodominant Epitope of Cartilage-Specific Type II Collagen in Early Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* Vol. 54, No. 1, January, pp 82–89.
28. Butcher EC, Picker LJ. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272:60-6.
29. Campbell I, Hamilton J, WicksI. (2000). Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* 30: 1568–1575
30. Carbone FR, Kurts C, Bennett SR. Miller JF. Heath WR. (1998). Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol. Today* 8, 368–373.
31. Carvajal R. Gonzalez G. Vargas N. Selman M. (1982). Cell mediated immunity against conective tissue in Experimental pulmonary fibrosis. *Lung* 60, 131 – 11.
32. Carvajal R. Manipulación de la respuesta inmune. UMSA. En impresión. 2008
33. Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A. (1999). Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med*; 189:821-9.

34. Chambers CA, Allison JP. (1999). Costimulatory regulation of T cell function. *Curr Opin Cell Biol*; 11:203-10.
35. Champe P, Harvey G, Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry. Philadelphia: J.B. Lippincott, 147 – 155. 1994.
36. Chan TO, Rittenhouse SE, Tschlis PN. (1999). AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 965–1014.
37. Chang J, Diveley J, Saravy J, Jensen F. (1998). Adjuvant activity of incomplete Freud's adjuvant. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 32:3, 173 – 186.
38. Chernajvsky Y, Annenkov A, Herman C, Triantaphyllopoulos C, Gould D, Dreja H. (1998). Gene therapy for rheumatoid arthritis: theoretical considerations. *Drug and Aging* 12:29.
39. Chernajvsky Y, Gould D, Annenkov A, Dreja H, Daly G, Ravinovich G. (1999). Immunotherapy of autoimmune disease by gene transfer. *Biochem Soc Trans.* 27: 869.
40. Chiocchia G, Boissier M, Fournier C. (1991). Therapy against murine collagen – induced Arthritis with T cell receptor V $\beta$  specific antibodies. *Eur. J. Immunol.* 21: 2899.
41. Cho Y, Cho M, Min S, Kim H. (2007), Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews* 7: 65-70.
42. Chu C, Londei M, (1996). Induction of Th2 cytokines and control of collagen-induced arthritis by non-depleting anti CD4 Abs. *J. Immunol.* 157: 2685.
43. Chui D, Sellakumar G, Green R, Sutton-Smith M, McQuistan T, Marek K, Morris H, Dell A, Marth J. (2001). Genetic remodeling of protein glycosylation *in vivo* induces autoimmune disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 1142–1147.
44. Cohen PL, Eisenberg RA. (1991). *Lpr* and *gld*: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 243–269.
45. Cook A, Gray R, Ramshaw J, Mackay I. y Rowley M. (2004). Antibodies against the CB10 fragment of type II collagen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 6:R477-R483.
46. Coombs y Gel. (1975) Clasificación de hipersensibilidad.

47. Cooper GS, Stroehla BC. (2003). The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* May; 2(3):119-25.
48. Craig EA. (1993). Chaperones: helpers along the pathways to protein folding. *Science*; 260:1902–3.
49. Cutolo M, Sulli A; Serio B. (2005). Estrogens, autoimmunity and the heart. *Lupus*, vol. 14, no. 9, pp. 675-678.
50. Cutolo M, Straub R, Bijlsma J. (2007). Neuroendocrine–immune interactions in synovitis. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. November vol 3 no 11.
51. Damian RT. (1964). Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. *Am. Nat.* XCVIII, 129–149
52. Davies JM, Rowley MJ, Mackay IR. (1999). Phagotopes derived by antibody screening of phage-displayed random peptide libraries vary in immunoreactivity: studies using an exemplary monoclonal antibody, CII-C1 to type II collagen. *Immunol Cell Biol*; 77:483– 90.
53. Deepak Y, Sarvetnick N. (2003). Cytokines and autoimmunity: redundancy defines their complex nature. *Current Opinion in Immunology*, 15:697-703.
54. Delves PJ, Roitt IM. (2000). The immune system. *N Engl J Med* 343:37-49.
55. Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. (2001). Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by *Mgat5* N-glycosylation. *Nature* 409, 733–739
56. den Boer A, Diehl L, van Mierlo GJ, van der Voort EI, Franssen MF, Krimpenfort P, Melief CJ, Offringa R, Toes RE. (2001). Longevity of antigen presentation and activation status of APC is decisive factors in the balance between CTL immunity versus tolerance. *J. Immunol.* 167, 2522–2528.
57. Duarte A. (1997). The collagen type II, Cure for Arthritis and Heart Disease. Published October 1997, ISBN # 1-891036-11-4.
58. Edward F. Rosloniec. (1996). An HLA –DR1 Transgene Confers Susceptibility to Collagen –induced arthritis elicited with Human type II collagen. *J. Immunol.* 159:2818 – 2827.
59. Edwards JC. (1994). The nature and origins of synovium: experimental approaches to the study of synoviocyte differentiation. *J Anat.*; 184(Pt 3):493-501.

60. Elias D, Markovits D, Reshef T, van der Zee R, Cohen IR. (1990). Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA*; 87:1576–80.
61. Elliot M, Maini R, Feldman M. (1994). Randomized double blind comparison of a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet*. 344:1105.
62. Encinas JA, Kuchroo VK. (2000). Mapping and identification of autoimmunity genes. *Curr Opin Immunol*; 12:691-7.
63. Falb D, Briner TJ, Sunshine GH. (1996). Peripheral tolerance in T cell receptor-transgenic mice: evidence for T cell anergy. *Eur J Immunol* 1996; 26:130-5. [Erratum, *Eur J Immunol*; 26:966.]
64. Falcone M, Sarvetnick N. (1999). Cytokines that regulate autoimmune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 670–676
65. Feldmann M. (2001). Pathogenesis of arthritis recent research progres. *Nature Immunolgy* Vol2, No 9, Septiembre.
66. Feldmann M, Brennan F, Maini R, (1996). Rheumatoid arthritis. *Cell* 85: 230.
67. Fink AL. (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev*, 79:425–49.
68. Fisher GH, Rosenberg FJ, Straus SE. (1995). Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell*; 81: 935-46.
69. Garza KM, Chan S, Suri R, Nguyen L, Odermatt B, Schoenberger S. P, Ohashi. (2000). Role of antigen-presenting cells in mediating tolerance and autoimmunity. *J. Exp. Med.* 191, 2021–2027
70. Geng L, Solimena M, Flavell RA, Sherwin RS, Hayday AC. (1998). Widespread expression of an autoantigen–GAD65 transgene does not tolerize nonobese diabetic mice and can exacerbate disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 10055–10060.
71. Gilchrist FC, Bunn C, Foley PJ, Lympany PA, Black CM, Welsh KI, Du Bois RM. (2001). Class II HLA associations with autoantibodies in scleroderma: a highly significant role of HLA-DP. *Genes Immun* 2:76–81. 373.
72. Girard JP, Springer TA. (1995). High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today*.; 16:449-57.
73. Goldbach-Mansky R, Lee J, McCoy A, Hoxworth J, Yarboro C, Smolen JS, Steiner G, Rosen A, Zhang C, Ménard HA, Zhou ZJ, Palosuo T, Van Venrooij

- WJ, Wilder RL, Klippel JH, Schumacher HR Jr, El-Gabalawy HS. (2000). Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res*; 2(3):236-43. Epub 2000 Mar 31.
74. Goodnow C, Crosbie J, Adelstein S. (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature*; 334:676-82.
75. Gorelik L, Constant S, Flavell RA. (2002). Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J Exp Med*. Jun 3; 195(11):1499-505.
76. Gorelik L. Flavell RA. (2002). Transforming growth factor- $\beta$  in T-cell biology. *Nature Rev. Immunol.* 2, 46–53.
77. Gourley M, Miller F. (2007). Mechanisms of Disease: environmental factors in the pathogenesis of rheumatic disease. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. March Vol 3. No 3.
78. Greenstein BD, Dhaher YY, Bridges EF, Keser G, Khamashta MA, Greenstein AS, Coates PJ, Hall PA, Hughes GRV. (1993). Effects of an aromatase inhibitor on thymus and kidney and on oestrogen receptors in female MRL:MP-*lpr.lpr* mice. *Lupus*; 2:221–5.
79. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. (1997). The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*; 30: 1205–13.
80. Gribben JG, Freeman GJ, Boussiotis VA, Rennert P, Jellis CL, Greenfield E. (1995). CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92:811–5.
81. Griffiths M, Wang J, Joe B, Dracheva S, Kawahito Y, Shepard J, Reese V, McCall-Vining S, Hashiramoto A, Cannon G. (2000). Identification of four new quantitative trait loci regulating arthritis severity and one new quantitative trait locus regulating autoantibody production in rats with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 43: 1278.
82. Gulko P, Kawahito Y, Remmers E, Reese V, Wang J, Dracheva S, Ge L, Longman R, Shepard J, Cannon G. (1998). Identification of a new non-major histocompatibility complex genetic locus on chromosome 2 that controls disease severity in collagen-induced arthritis in rats. *Arthritis Rheum.* 41: 2122.
83. Hanly W. (1994) Overview of adjuvants. BRL. Bulletin.
84. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC. (2001). Dendritic cells induce peripheral T-

- cell unresponsiveness under steady-state conditions *in vivo*. *J. Exp. Med.* 194, 769–779.
85. Heath WR, Carbone FR. (2001). Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 47–64.
  86. Helgason CD, Damen JE, Rosten P, Grewal R, Sorensen P, Chappel SM, Borowski A, Jirik F, Krystal G, Humphries RK. (1998). Targeted disruption of *SHIP* leads to hemopoietic perturbations, lung pathology and a shortened lifespan. *Genes Dev.* 12, 1610–1620.
  87. Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvetnick N. (1998). Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med*; 4:781-5.
  88. Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. (2000). Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 165: 6107-15.
  89. Jacobsen M, Schweer D, Ziegler A, Gaber R, Schock S, Schwinzer R, Wonigeit K, Lindert RB, Kantarci O, Schaefer-Klein J, Schipper HI, Oertel WH, Heidenreich F, Weinshenker BG, Sommer N, Hemmer B. (2000). A point mutation in *PTPRC* is associated with the development of multiple sclerosis. *Nature Genet.* 26, 495–499.
  90. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunobiology V 5<sup>o</sup> edicion, Taylor and Francis Group, 2001.
  91. Jansson A, Jacobsson L, Luthman H, Lorentzen JC, (1999). Susceptibility to oil – induced arthritis is linked to Oia2 on chromosome 4 in a DA (DAX PVG. 1AV1) backcross. *Transplant. Proc.* 31: 1597.
  92. Jimenez C, Jones DR, Rodríguez-Viciano P, Gonzalez-García A, Leonardo E, Wennström S, von Kobbe C, Toran JL, R-Borlado L, Calvo V, Copin SG, Albar JP, Gaspar ML, Diez E, Marcos MA, Downward J, Martinez-A C, Mérida I, Carrera AC. (1998). Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *EMBO J.* 17, 743–753.
  93. Jimenez SA, Bashey RI, Benditt M & Yankowski R (1977) Identification of collagen alpha1(I) trimer in embryonic chick tendons and calvaria. *Biochem Biophys Res Com* 78: 1354–1361.
  94. Jirholt J, Cook A, Emahazion T, Sundvall M, Jansson L, Nordquist N, Pettersson U, Holmdahl R. (1998). Genetic linkage analysis of collagen-induced arthritis in the mouse. *Eur. J. Immunol.* 28:3321 – 3328.



95. Johnson RW, Tew MB, Arnett FC. (2002). The genetics of systemic sclerosis. *Curr Rheumatol Rep.* 4:99–107.
96. Jorgensen C, Gay S. (1998). Gene therapy in osteoarticular diseases: where are we? *Immunol Today* 19: 387.
97. Kagari T, Doi H, Shimoizato T. (2002). The importance of IL-1 beta and TNF-alpha, and the noninvolvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. *J Immunol*; 169: 1459–66.
98. Kamradt T, Soloway PD, Perkins DL, Geffer ML. (1991). Pertussis toxin prevents the induction of peripheral T cell anergy and enhances the T cell response to an encephalitogenic peptide of myelin basic protein. *J Immunol*; 147:3296-302.
99. Kastbom A., Strandberg G., Lindroos A. and Skogh T. (2004). Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). *Ann Rheum Dis*;63:1085–1089.
100. Kawahito Y, Cannon G, Gulko P, Remmers E, Logman R, Reese V, Wang J, Griffiths M, Wilder R, (1998). Localization of quantitative trait loci regulating adjuvant-induced arthritis in rats: evidence for genetic factors common to multiple autoimmune disease. *J. Immunol.* 161: 4411.
101. Khare SD, Krco CJ, Griffiths MM, Luthra HS, David CS. (1995). Oral administration of an immunodominant human collagen peptide modulates collagen-induced arthritis. *J Immunol.* Oct 1; 155(7):3653-9.
102. Khare SD, Luthra HS, David CS. (1999). Animal models of human leukocyte antigen B27-linked arthritides. *Rheum Dis Clin North Am*; 25.
103. Kim W, Yoo WH, Park W, Kang YM, Kim SI, Park JH, Lee SS, Joo YS, Min JK, Hong YS, Lee SH, Park SH, Cho CS, Kim HY. (2000). IgG antibodies to type II collagen reflect inflammatory activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* Mar;27(3):575-81.
104. Kivaniemi H., Tromp G., Prockop D. J., (1997) Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III and XI), fibril – associated collagen (type IX), and network – forming collagen (type X) cause a spectrum of disease of bone, cartilage, and blood vessels. *Hum. Mutat.* 9: 300 – 315.
105. Klein J, Sato A. (2000). The HLA system. *N Engl J Med*; 343:782-6.
106. Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. (1996). CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:2879-83.

107. Koch AE, Burrows JC, Haines GK, Carlos TM, Harlan JM, Leibovich SJ. (1991). Immunolocalization of endothelial and leukocyte adhesion molecules in human rheumatoid and osteoarthritic synovial tissues. *Lab Invest*, 64:313-20.
108. Koivula M, Heliovaara M, Ramberg J, Knekt P, Rissanen H, Palosuo T, Risteli J. (2007). Autoantibodies binding to citrullinated telopeptide of type II collagen and to cyclic citrullinated peptides predict synergistically the development of seropositive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66:1450–1455.
109. Krammer, PH. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789–795.
110. Krause I, Blank M, Shoenfeld Y. (1999). New treatment avenues: oral tolerance--mechanisms and applicability to human diseases. *Isr Med Assoc J. Sep*; 1(1):45-9.
111. Krawczyk C, Bachmaier K, Sasaki T, Jones RG, Snapper SB, Bouchard D, Kozieradzki I, Ohashi PS, Alt FW, Penninger JM. (2000). Cbl-b is a negative regulator of receptor clustering and raft aggregation in T cells. *Immunity* 13, 463–473.
112. Krummel MF, Allison JP. (1996). CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med*; 183: 2533–40.
113. Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ. (1997). Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. *Hum Mutat.*; 9(4):300-15.
114. Kurtzke JF. (1994). Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev*;7: 141.
115. Lee SK, Poole AR. (1996). Ultrastructural localization of the C – propeptide released from type II procollagen in fetal bovine growth plate cartilage. *J. Histochem. Cytochem.* 44: 433 – 443.
116. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*; 14:233–58.
117. Lindsay S. (2001). Mechanistic studies of organic and bio-organic oxidations. *J. Chem. Soc.* 28, 201.
118. Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Weisman M, Emery P, Feldmann M, Harriman GR, Maini RN; Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant

- Therapy Study Group. (2000). Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med.* Nov 30; 343(22):1594-602.
119. Liston A, Lesage S, Willson J, Peltonen L, Goodnow C. (2003). Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* 4:350 – 354.
120. Liu Z, Geboes K, Hellings P, Maerten P, Heremans H, Vandenberghe P. (2001). B7 interactions with CD28 and CTLA-4 control tolerance or induction of mucosal inflammation in chronic experimental colitis. *J. Immunol*; 167:1830–8.
121. Lu Q, Lemke G. (2001). Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro-3 family. *Science* 293, 306–311.
122. Lühder F, Katz J, Benoist C, Mathis D. (1998). Major histocompatibility complex class II molecules can protect from diabetes by positively selecting T cells with additional specificities. *J. Exp. Med.* 187, 379–387
123. Lühder F, Chambers C, Allison JP, Benoist C, Mathis D. (2000). Pinpointing when T cell costimulatory receptor CTLA-4 must be engaged to dampen diabetogenic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12204-9.
124. Lundberg K, Nijenhuis S, Vossenaar ER, Palmblad K, van Venrooij WJ, Klareskog L, Zendman AJ, Harris HE. (2005). Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. *Arthritis research and Therapy* Vol 7, Nro 3.
125. Lynch KP, Weiss A. (2001). A CD45 polymorphism associated with multiple sclerosis disrupts an exonic splicing silencer. *J. Biol. Chem.* 276, 24341–24347.
126. Lynn R, Fox J. (1995). Adjuvants and antibody production Institutional Policies and Guidelines on adjuvants and antibody production. *ILAR Journal*, 37: 3.
127. Mackay I, Rowley M. (2004). Autoimmune epitopes: autoepitopes. *Autoimmunity reviews.* 3:487-492.
128. McMaster University Department of Clinical Epidemiology and Biostatistics. *Can. Med. Assoc. J.* 1983; 129: 429-432; 559-564; 705-710; 832-835; 947-954; 1093-1099.

129. Majeti R, Xu Z, Parslow TG, Olson JL, Daikh DI, Killeen N, Weiss A. (2000). An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity. *Cell* 103, 1059–1070.
130. Makrygiannakis D, Klint E, Löfberg R, Ulfgren, Klareskog L. (2006)0. Citrullination is an inflammation-dependent process. *Ann Rheum Dis*, 65:1219-1222.
131. Mariathasan S, Zakarian A, Bouchard D, Ohashi, PS. (2001). Duration and strength of extracellular signal-regulated kinase signals are altered during positive versus negative thymocyte selection. *J. Immunol.* 167, 4966–4973
132. Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. (2001). Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nature Med.* 7, 899–905
133. Masson-Bessie`re C, Sebbag M, Girbal-Neuhauser E, Nogueira L, Vincent C, Senshu T, Serre G. (2001). The Major Synovial Targets of the Rheumatoid Arthritis-Specific Antifilaggrin Autoantibodies Are Deiminated Forms of the  $\alpha$ - and  $\alpha$ -Chains of Fibrin. *The Journal of Immunology*, 166: 4177–4184.
134. Mayne R. (1989). Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease. *Arthritis Rheum.* 32: 241 – 246.
135. McIndoe RA, Bohlman B, Chi E, Schuster E, Lindhardt M, Hood L. (1999). Localization of non-Mhc collagen-induced arthritis susceptibility loci in DBA/1j mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* Mar 2; 96(5):2210-4.
136. Medsger TA. Systemic sclerosis (scleroderma): clinical aspects. 14th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. (2001).
137. Miller SD, Vanderlugt C, Smith-Begolka W. (1997). Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat. Med.* 3: 1133 – 1136.
138. Morgan M, Witteveen H, Suttmuller R, Vries R, Toes R. (2004). Transgenic Mice Are Capable of Modulating Collagen-Induced Arthritis. *J.Human Immunology.*06.011.
139. Morris H, Abdala R, Campos D. (1999). Adyuvantes inmunológicos. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* 18(2): 130-137.
140. Mullazehi M, Mathsson L, Lampa J, Rönnelid J. (2007). High anti-collagen type-II antibody levels and induction of proinflammatory cytokines by anti-collagen antibody-containing immune complexes in vitro characterise a distinct rheumatoid arthritis phenotype associated with acute inflammation at the time of disease onset. *Ann Rheum Dis* 66:537–541.

141. Müller-Ladner U, Pap T, Gay R, Neidhart M, Gay S. (2005). Mechanisms of Disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. December vol 1 no 2
142. Nagata S, Suda T. (1995). Fas and Fas ligand: *lpr* and *gld* mutations. *Immunol. Today* 16, 39–43 77.
143. Nagler AC, Bober LA, Robinson M. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83, 7443-6.
144. Nandakumar K, Svensson L, Holmdahl R. (2003). Collagen Type II –specific Monoclonal antibody-induced Arthritis in mice: description of the Disease and the Influence of Age, Sex and genes. *American Journal of Pathology*. 163: 1827 – 1837.
145. Nandakumar K., Bäcklund J., Vestberg M., Holmdahl R. (2004). Collagen type II (CII) specific antibodies induced arthritis in the absence of T or B cell but the arthritis progression is enhanced by CII = reactive T cells. *Arthritis Res. Ther.* 6: R544 – R 550.
146. Nandakumar K, Lindqvist A, Holmdahl R. (2006). A dominant suppressive MHC haplotype (H-2d) regulates development of autoimmunity and chronicity of collagen induced arthritis. 1st International MUGEN *Conference on Animal Models for Human Immunological Disease*. September 10-13, 2006. Athens Greece.
147. Naramura M, Kole HK, Hu RJ, Gu H. (1998). Altered thymic positive selection and intracellular signals in Cbl deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95, 15547–15552.
148. Nelson F, Dahlberg L. (1998). Evidence for Altered Synthesis of Type II Collagen in Patients with Osteoarthritis. *J. Clin. Invest.* Vol. 102, N°12, December, Pag 2115 – 2125.
149. Nemazee D. (2000). Receptor selection in B and T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*; 18:19-51.
150. Nemazee JC, Burki K, (1989). Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature*; 337: 562 – 566.
151. Oesser S, Seifer J, (2003). Stimulation of type II collagen biosynthesis and Secretion in bovine Chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell Tissue Res*, 311: 393 – 399.
152. Ohashi PS, Oehen S, Buerki K. (1991). Ablation of “tolerance” and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 65:305-17.

153. Ohashi, PS. (1996). T-cell selection and autoimmunity: flexibility and tuning. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 808–814.
154. Oldstone MBA. (1987). Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 50, 819–820
155. Oldstone MBA, Nerenberg M, Southern P, Price J, Lewicki H. (1991). Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell* 65, 319–331
156. O'Shea JJ, Ma A, Lipsky PE. (2002). Cytokines and autoimmunity. *Nature Rev. Immunol.* 2, 37–45.
157. Parslow T. Medical Immunology. Décima edición; Editorial McGraw Hill. 2001.
158. Parsons MJ, Jones RG, Tsao MS, Odermatt B, Ohashi PS, Woodgett JR. (2001). Expression of active PKB in T cells perturbs both T- and B-cell homeostasis and promotes inflammation. *J. Immunol.* 167, 42–48
159. Peltonen L, Halila R, Ryhänen L, (1985) Enzymes converting procollagens to collagens. *J. Cell. Biochem.* 28: 15 – 21.
160. Perron H, Garson JA, Bedin F. (1997). Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94:7583-8.
161. Pircher H, Hoffmann-Rohrer U, Moskophidis D, Zinkernagel R, Hengartner H. (1991). Lower receptor avidity required for thymic clonal deletion than for effector T-cell function. *Nature* 351, 482–485.
162. Poole RA. Cartilage in Health and Disease. In Arthritis and Allied Conditions. A Textbook in Rheumatology, 12<sup>th</sup> Ed. D. McCarthy and W. Koopman, Editors. Lea and Fediger, Philadelphia. 279 – 333. 1993.
163. Prakken AB, van Eden W, Rijkers GT, Kuis W, Toebes EA, de Graeff-Meeder ER. (1996). Autoreactivity to human heat-shock protein 60 predicts disease remission in oligoarticular juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*; 39:1826–32.
164. Prakken BJ, Samodal R, Le TD, Giannoni F, Yung GP, Scavulli J, (2004). Epitopespecific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101:4228–33.
165. Prockop DJ, Kivirikko KI, Tuderman L, Guzman NA. (1979), The Biosynthesis of collagen and its disorders. *N. Eng. J. Med.* 301: 13 – 23.

166. Ramsdell F, Ziegler S. (2003). Transcription factors in autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*. 15:718 – 724.
167. Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij WJ. (2003). Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. Oct; 48(10):2741-9.
168. Rathmell JC, Townsend SE, Xu JC, Flavell RA, Goodnow CC. (1996). Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell*; 87: 319-29.
169. Ravinovich G. (2002). Apoptosis as a target for gene therapy in rheumatoid arthritis. *Mem. Inst. Osw. Cruz*. 95:225..
170. Ravinovich G. *Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina, un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica*. 1º Edición Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2004.
171. Raz I, Elias D, Avron A, Tamir M, Metzger M, Cohen IR. (2001). Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet*; 358:1749–53.
172. Raza K, Breese M, Nightingale P, Kumar K, Potter T, Carruthers DM, Situnayake D, Gordon C, Buckley CD, Salmon M, Kitis GD. Predictive value of antibodies to cyclic citrullinated peptide in patients with very early inflammatory arthritis. *J Rheumatol*. 2005 Feb; 32(2):231-8.
173. Remmers E, Longman R, Du Y, O'Hare A, Cannon G, Griffiths M, Wloder R. (1996). A genome scan localizes five non-MHC loci controlling collagen-induced arthritis in rats. *Nat. Genet*. 14:82.
174. Ridgway WM, Fathman CG. (1999). MHC structure and autoimmune T-cell repertoire development. *Curr. Opin. Immunol*. 11, 638–642.
175. Riegelman AK, Hirsch AP. (1991). Cómo estudiar un estudio y probar una prueba: lectura crítica de la literatura médica. *Bol Of. Snit. Panam*. 111:534-555.
176. Rieux-Laucat F, Le Deist F, Hivroz C, (1995). Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268, 1347–1349.

177. Risteli J, Risteli L (1999). Products of bone collagen metabolism. In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP (eds) Dynamics of bone and cartilage metabolism, *Academic Press*, San Diego: 275–287.
178. Rochas C, Hillion S, Youinou P, Jamin C, Devauchelle-Pensec V. (2007). RAG-mediated secondary rearrangements of B-cell antigen receptors in rheumatoid synovial tissue. *Autoimmunity Reviews* 7 155–159.
179. Roman-Blas JA, Jimenez S. (2006). NF- $\kappa$ B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *OsteoArthritis and Cartilage* 14, 839 – 848.
180. Ronca F, Palmieri L, Panicucci P, Ronca G. (1998). Anti-inflammatory activity of chondroitin sulfate. *Osteoarthritis & Cartilage*, 6 (suppl A) Pags. 14 – 21.
181. Ryan R, Ben D, Greenstein. (2000). Evidence for pleomorphism of estrogen receptor capacity and affinity in liver and thymus of immature BALB:c and (NZB\_NZW) F1 mice, a model of systemic lupus erythematosus *International Journal of Immunopharmacology* 22 897–903.
182. Russell JH, Rush B, Weaver C, Wang R. (1993). Mature T cells of autoimmune *lpr/lpr* mice have a defect in antigenstimulated suicide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90, 4409–4413.
183. Sabelko-Downes KA, Russell JH. (2000). The role of Fas ligand *in vivo* as a cause and regulator of pathogenesis. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 330–335
184. Sakaguchi S. (2000). Cause and etiological mechanism of rheumatic arthritis using animal models. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 23: 497 – 498.
185. Santiago-Raber ML, Lawson BR, Dummer W, Barnhouse M, Koundouris S, Wilson CB, Kono DH, Theofilopoulos AN. (2001). Role of cyclin-kinase inhibitor p21 in systemic autoimmunity. *J. Immunol.* 167, 4067–4074.
186. Satpute S, Soukhareva N, Scott D. y Moudgil K. (2007). Mycobacterial Hsp65-IgG-Expressing Tolerogenic B Cells Confer Protection Against Adjuvant-Induced Arthritis in Lewis Rats. *Arthritis & Rheumatism* Vol. 56, No. 5, May, pp 1490–1496.
187. Schellekens GA, De Jong B, Van der Hoogen F, Van de Putte L, Van Venrooij W. (1998). Citrulline is a essential constituent if antigenic determinants recognized by Rheumatoid Arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* 101, 273 – 381.
188. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ. (2000). The diagnostic properties of



- rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* Jan; 43(1):155-63.
189. Schett G, Hayer S, Zwerina J, Redlinch K, Smolen J. (2005). Mechanisms of disease: the link between RANKL and arthritic bone disease. *Nature Clinical of Rheumatology*, Vol 1, Nro 1.
  190. Schulte S, Unger C, Mo JA, Wendler O, Bauer E, Frischols S, (1998). Arthritis-related B cell epitopes in collagen II are conformation-dependent and sterically privileged in accessible sites of cartilage collagen fibrils. *J Biol Chem* 273:1551– 6.
  191. Schulte S. Unger C. (2000). Arthritis -related B cell Epitopes in collagen. Are conformation–dependent and sterically privileged in accessible sites of cartilage collagen fibrils. *J. Immunol.* 292: 488- 492.
  192. Schultz RM, Liebman MN. Proteins: Composition and structure. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. Ed T.M. Devlin, Pag. 26 – 77. (1992).
  193. Scotton C, Chambers R. (2007). Molecular Targets in Pulmonary Fibrosis: The Myofibroblast in Focus. *Chest*, 132;1311-1321.
  194. Sebzda E, Mariathasan S, Ohteki T, Jones R, Bachmann M, Ohashi P. (1999). Selection of the T-cell repertoire. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 829–874
  195. Seibold JR. (2001). Scleroderma. In: Ruddy S, Harris ED, Sledge CB, editors. Kelley's textbook of rheumatology. 6th Philadelphia: W.B. Saunders Company; p. 1211–40. 347.
  196. Shevach EM. (2000). Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 423–449.
  197. Sieper J, Kary S, Sörensen H, Alten R, Eggens U, Hüge W, Hiepe F, Kühne A, Listing J, Ulbrich N, Braun J, Zink A, Mitchison NA. (1996). Oral type II collagen treatment in early rheumatoid arthritis. A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Arthritis Rheum.* Jan; 39(1):41-51.
  198. Simon M, Girbal E, Sebbag M, Gomès-Daudrix V, Vincent C, Salama G, Serre G. (1993). The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called 'antikeratin antibodies,' autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 92:1387–93.
  199. Singer GG, Abbas AK. (1994). The Fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T-cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1, 365–371.

200. Sneller MC, Wang J, Dale JK, Strober W, Middleton LA, Choi Y, Fleisher TA, Lim MS, Jaffe ES, Puck JM, Lenardo MJ, Straus SE. (1997). Clinical, immunologic and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Blood* 89, 1341–1348.
201. Suzuki K, Sawada T, Murakami A, Matsui T, Tohma S, Nakazono K, Takemura M, Takasaki Y, Mimori T, Yamamoto K. (2003). High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*; 32:197–204.
202. Svensson L, Jirholt J, Holmdahl R. (1998). B-cell – deficient mice do not develop type II collagen – induced Arthritis (CIA). *Clin. Exp. Immunol.* 111: 521.
203. Tak PP, Turkow EW, Daha MR, Kluin PM, Smeets TJ, Meinders AE. (1995). Expression of adhesion molecules in early rheumatoid synovial tissue. *Clin Immunol Immunopathol.*; 77:236-42.
204. Taneja V, David CS. (1999). HLA class II transgenic mice as models of human diseases. *Immunol Rev*, 169:67-79.
205. Tellez M. (1998). Determinación de parámetros básicos en Histocompatibilidad: frecuencia de especificidades serológicas HLA, haplotipos y desequilibrio de ligamiento en la población mestiza boliviana y asociación de estos parámetros en pacientes con patología renal terminal de diversa etiología. Tesis de grado.Facultad de Bioquímica – SELADIS.
206. Terato K, Harper DS, Griffiths MM, Hasty DL, Ye XJ, Cremer MA. (1995). Collagen-induced arthritis in mice: synergistic effect of E. coli lipopolysaccharide bypasses epitope specificity in the induction of arthritis with monoclonal antibodies to type II collagen. *Autoimmunity*; 22:137–47. Thermo Electron Corporation. Microtiter Plate Guide. Catalog. 2005.
207. Thien CBF, Langdon WY. (2001). CBL: many adaptations to regulate protein-tyrosine kinases. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 294–305.
208. Thomas-Vaslin V, Damotte D, Coltey M, Le Douarin N, Coutinho A, Salaün J, (1997). Abnormal T-cell selection on NOD thymic epithelium is sufficient to induce autoimmune manifestations in C57BL/6 athymic nude mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 4598–4603
209. Thomson SG, Staines NA. (1985). *Clin. Exp. Immunol.* 64, 581-6.
210. Thomson SJ, Harper N, Bevan DJ, (1993). *Autoimmunity.* 16, 189-99.
211. Thomson SJ, Thomson HS, Harper N. (1993). *Immunology,* 79, 152-7.

212. Tijssen P. (1993). Quantitative enzyme immunoassay techniques. Practice and theory of enzyme immunoassays. Amsterdam: *Elsevier Science*, 1993:329-44.
213. Tough DF, Sun S, Sprent J. (1997). T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS). *J Exp Med*; 185:2089-94.
214. Trentham DE, Dynesius-Trentham RA, Orav EJ. (1993). *Science*. 261, 1727-30.
215. Tsui FWL, Tsui HW. (1994). Molecular basis of the *motheaten* phenotype. *Immunol. Rev.* 138, 185–206.
216. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. (2005). Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis research and Therapy* Vol 7, Nro 5.
217. van Duivenvoorde LM, Han WG, Bakker AM, Louis-Pence P, Charbonnier LM, Apparailly F, van der Voort EI, Jorgensen C, Huizinga TW, Toes RE. (2007). Immunomodulatory dendritic cells inhibit Th1 responses and arthritis via different mechanisms. *J Immunol.* Aug 1; 179(3):1506-15.
218. van Eden W, Hauet-Broere F, Berlo S, Paul L, van der Zee R, de Kleer I, (2005). Stress proteins as inducers and targets of regulatory T cells in arthritis. *Int Rev Immunol* 24(3–4):181–97.
219. Van Gaalen, F. Linn-Rasker S, van Venrooij W, de Jong B, Breedveld F, Verweij C, Toes R, Huizinga T. (2004). Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to Rheumatoid Arthritis in patients with undifferentiated arthritis. *Arthritis Rheum.* 50, 709 – 715.
220. Verwilghen J, Lovis R, De Boer M, Linsley PS, Haines GK, Koch AE. (1994). Expression of functional B7 and CTLA4 on rheumatoid synovial T cells. *J Immunol*; 153:1378–85.
221. Vingsbo-Lundberg C, Nordquist N, Olofsson P, Sundvall M, Saxne T, Pettersson U, Holmdahl (1998). Genetic control of Arthritis onset, severity and chronicity in a model for rheumatoid arthritis in rats. *Nat. Genet.* 20: 401.
222. Viola A, Lanzavecchia A. (1996). T-cell activation determined by T-cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 273, 104–106.
223. Visser H, le Cessie S, Vos K, Breedveld FC, Hazes JM. (2002). How to diagnose Rheumatoid Arthritis early? A prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum.* 46, 357 – 365.

224. Von Feldt JM, Maldonado M, Peter E, Callegari E, Williams W. (1998) Biological Agents in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. Spring Vol. 11, Pags.79 – 86.
225. Vossenaar E, Nijenhuis S, Helsen M, van der Heijden A, Senshu T, Van den Berg W, Van Venrooij W, Joosten L. (2003). Citrullination of Synovial Proteins in Murine Models of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* Vol. 48, No. 9, September pp 2489–2500.
226. Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. (2003). PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 25:1106–18.
227. Vossenaar E, van Venrooij W. (2004). Anti – CCP antibodies, a highly specific marker for (early) Rheumatoid Arthritis. *Clin. Applied Imm. Rev.* 4, 239 – 262.
228. Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ. (2004). Citrullination, a possible functional link between susceptibility genes and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 6:1–5.
229. Vyacheslav A. Adarichev, Valdez J. C. (2003). Combined Autoimmune Models of Arthritis Reveal Shared and Independent Qualitative (Binary) and Quantitative Trait Loci. *The Journal of Immunology.* 170: 2283 -2292.
230. Wakeland EK, Liu K, Graham RR, Behrens TW. (2001). Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity* 15, 397–408
231. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1:405–13.
232. Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. (1996). CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med*, 183:2541–50.
233. Wang Y, Kristan J, Hao L, Lenkoski CS, Shen Y, Matis LA. (2000). A role for Complement in Antibody – Mediated Inflammation: C5- deficient DBA/1 mice are resistant to Collagen – Induced Arthritis. *The Journal of Immunology*, 164: 4340-4347.
234. Watanabe Y, Naiki M, Wilson T, Godfrey T, Chiang BL, Boyd R, Ansari A, Gershwin ME. (1993). Thymic microenvironmental abnormalities and thymic selection in NZB H-2bm12 mice. *J. Immunol.* 150, 4702–4712
235. Wendling U, Paul L, van der Zee R, Prakken B, Singh M, van Eden W. (2000). A conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-

- producing T cells that cross-react with the mammalian self-hsp70 homologue. *J Immunol*; 164:2711–17.
236. Weiner HL. (1994). Oral tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*. Nov 8; 91(23):10762-5.
237. Weir M. Handbook of Experimental Immunology, 5° Ed. 1996, ISBN 3 Volume set. Pags 192.5 – 192.6.
238. Wigley FM. Systemic sclerosis. Clinical features. In: Klippel JH, Dieppe PA, editors. Rheumatology. 2nd London: Mosby; p. 9.1–14. Section 7. 1998..
239. Wilder R, Griffiths M, Remmers E, Cannon G, Caspi R, Kawahito Y, Gulko P, Longman R, Dracheva S, Du Y. (1999). Localization in rats of genetic loci regulating susceptibility to experimental erosive arthritis and related autoimmune diseases. *Transplant. Proc.* 31:1585.
240. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Bricarelli FD, Byrne G, McEuen M, Proll S, Appleby M, Brunkow ME. (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse *scurfy*. *Nature Genet.* 27, 18–20.
241. Williams R, Feldman M, Maini R. (1992). Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc. Natl Acad Sci USA* 89: 9784.
242. Windhagen A, Newcombe J, Dangond F, Strand C, Woodroffe MN, Cuzner ML. (1995). Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions. *J Exp Med*; 182:1985–96.
243. Xiao BG, Link H. (1997). Mucosal tolerance: a two-edged sword to prevent and treat autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol.* Nov; 85(2):119-28.
244. Xu Y, Ramsland PA, Davies JM, Scealy M, Nandakumar KS, Holmdahl R, (2004). Two monoclonal antibodies to precisely the same epitope of type II collagen select non-cross reactive phage clones by phage display: implications for autoimmunity and molecular mimicry. *Mol Immunol* 41:411– 9.
245. Yagi J, Janeway C. (1990). Ligand thresholds at differentstages of T-cell development. *Int. Immunol.* 2, 83–89.
246. Yang H, Jirholt J, Svensson L, Sundvall M, Jansson L, Pettersson U, Holmdahl R. (1999). Identification of genes controlling collagen – induced

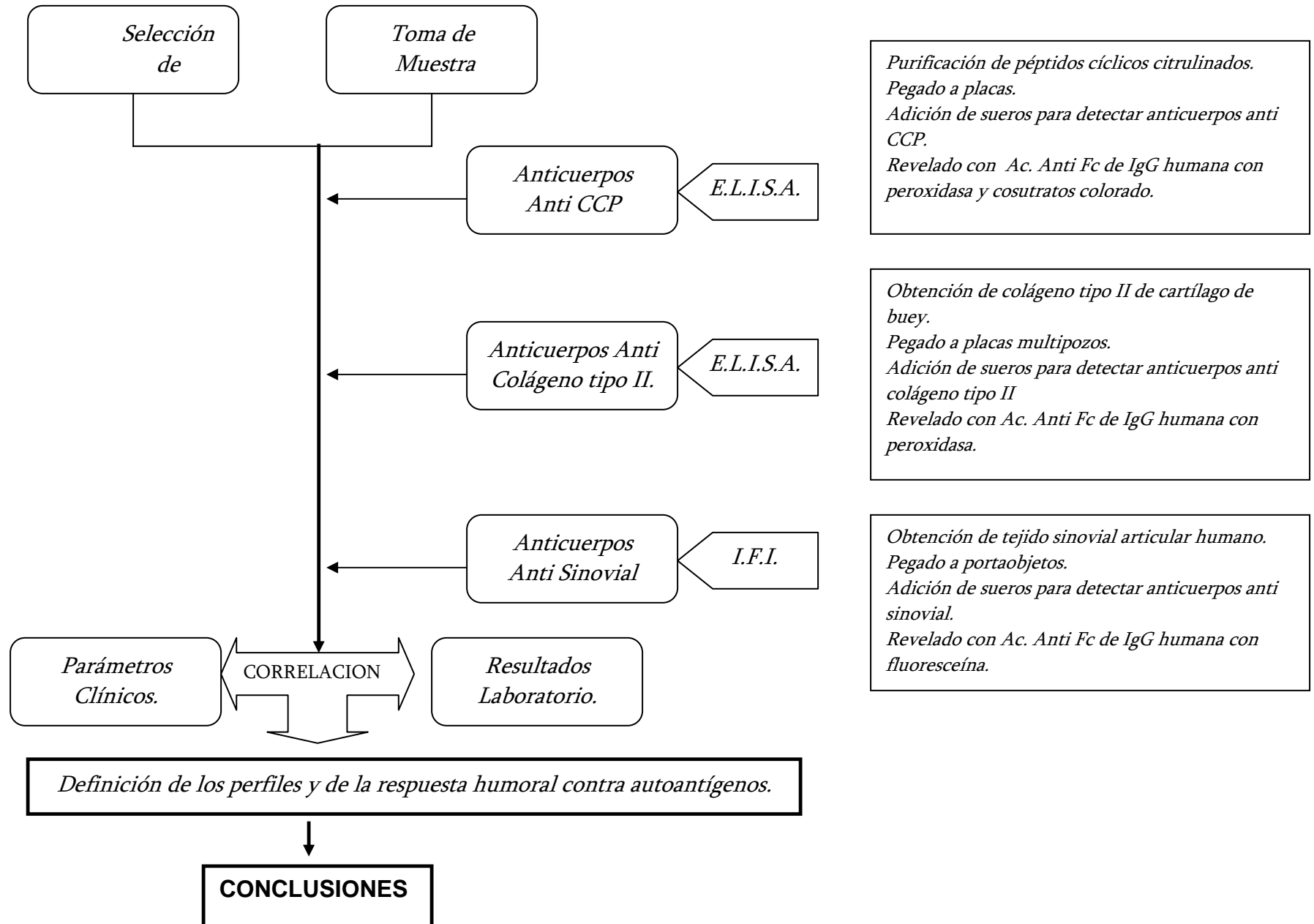
arthritis in mice: striking homology with susceptibility loci previously identified in the rat. *J. Immunol.* 163: 2916.

247. Zhang ZJ, Lee CSY, Lider O. (1990). *J. Immunology.* 145, 2489-93.

248. Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B. Zhang L. (2000). Identification of a previously unknown antigenspecific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nature Med.* 6, 782–789.

249. [www.chondrex.com](http://www.chondrex.com). "Native Type II Collagen Detection Kit".

## ESTRATEGIA DE EJECUCIÓN Y RUTA CRÍTICA.



# RECONOCIMIENTO DEL AUTOANTIGENO

# PROCESO DE INFLAMACIÓN

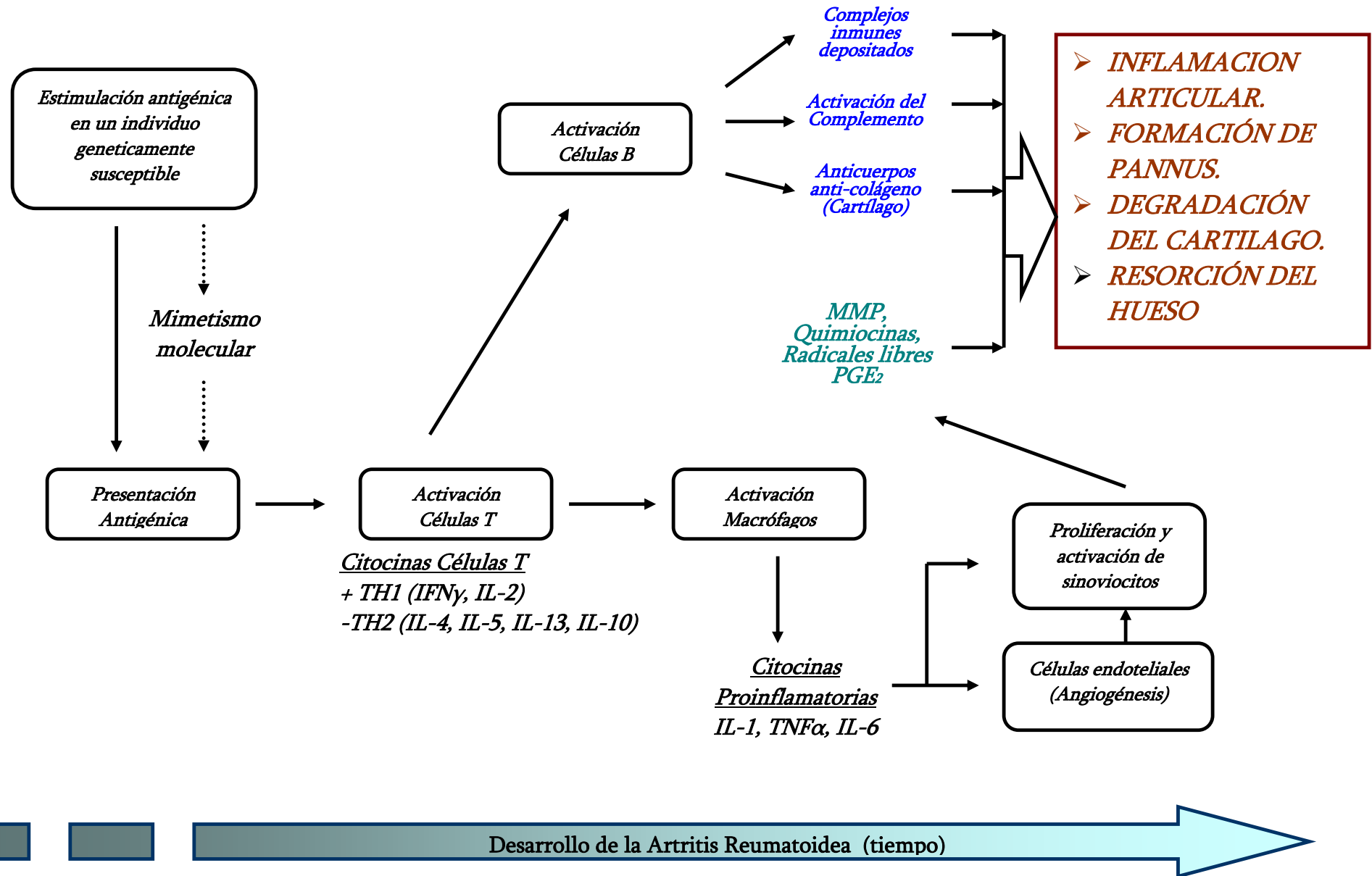


Figura 3. Mecasnismo celulares y moleculares en la Artritis Reumatoidea.



## ANEXOS

## HISTORIA CLINICA

Nombre: .....

Edad: .....

Procedencia.....

Diagnostico.....

Año: .....

Tratamiento	Dosis	Tiempo.

Respuesta al Tratamiento.

GRADO DE MEJORIA	DIAS	SEMANAS	MESES
Excelente	Dolor No            Si	Movimiento No            Si	Actividad No            Si
Buena	Dolor No            Si	Movimiento No            Si	Actividad No            Si
Regular	Dolor No            Si	Movimiento No            Si	Actividad No            Si
Mala	Dolor No            Si	Movimiento No            Si	Actividad No            Si

HISTORIA CLINICA

Nombre: .....

Edad: .....

Procedencia/residencia: .....

Antecedentes.				
Infecciones recientes	Bacteriana	Viral	Otros	
Recurrentes.				
Artralgias	Manos	Codos	Hombros	
Si .....	Pies	Rodillas	Caderas	
No .....				
Antecedentes patológicos				
Procesos de cicatrización	Rápido	Lento	Queloides.	
Dieta	Rica en carne Rica en cartilago	Pobre en carne Pobre en cartilago	Vegetariana	
Fuma.	.....cigarrillo/ día	.....cigarrillo/ semana	.....cigarrillo/ mes	
Si .....	tiempo.....	tiempo.....	tiempo.....	
No .....				
Bebe.	.....veces/ semana	Llega al estado de embriaguez		
Si .....	tiempo.....	Si		
No .....		No		
Domicilio calle	Tierra	Empedrado	Adoquinado	Asfaltado
Fabricas cerca. Tipo de fábrica u otros contaminantes.				