

## PERFIL DE LA RESPUESTA DE AUTOANTICUERPOS EN ARTROPATÍAS

### AUTOANTIBODIES PROFILES IN ARTHROPATHIES

Deyni Torrez, M.D, M.Sc.<sup>1</sup>, Milet Curcuy, M.D.<sup>2</sup>, Roger Carvajal, M.D., Ph.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Biomedicina Experimental, Instituto de Servicios de Laboratorio y de Diagnostico e Investigación en Salud SELADIS. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, UMSA.

<sup>2</sup>Laboratorio de Patología, Hospital Militar, COSSMIL.

**Autor para Correspondencia:** deynitorrezbotello@hotmail.com

### RESUMEN

Dentro de las enfermedades autoinmunes, la Artritis Reumatoide es una de las más estudiadas, dada su alta prevalencia. Numerosos estudios han reportado como posible mecanismo gatillante la existencia de una respuesta inmune contra el Colágeno tipo II. El presente trabajo busca contribuir al conocimiento y significación de este proceso, a través de la determinación de diferentes autoanticuerpos en sujetos con Artritis Reumatoide (diagnosticados bajo criterios del American College of Rheumatology) y en sujetos con artralgias inespecíficas en comparación con sujetos normales. Para esto, se realizó un estudio descriptivo, de corte transversal, en el que se determinó la presencia, en sueros, de anticuerpos anti-colágeno tipo II y de anticuerpos anti-Péptidos Cíclicos Citrulinizados (CCP) por ELISA y de Anticuerpos anti-sinovial por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) con métodos previamente estandarizados de acuerdo a procedimientos convencionales. No se encontró diferencia significativa entre los promedios de los niveles de los anticuerpos anti-colágeno tipo II en los 3 grupos; sin embargo, la distribución de los títulos de anticuerpos presenta, en los tres grupos, curvas de frecuencia de tipo bi-modal cuyos perfiles son totalmente diferentes entre ellos. En este orden, se identificó un subgrupo conformado por el 20% del grupo con Artritis Reumatoide quienes presentaban anticuerpos anti-colágeno tipo II con niveles muy altos, por encima de las dos desviaciones estándar; dichos sujetos correspondían a adultos jóvenes (edad promedio 41 años) que no recibieron tratamiento inmunosupresor.

No se encontró ninguna correlación entre los niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II, los anticuerpos anti-CCP, y los de anticuerpos anti-sinovial. Se discute la significación de estos hallazgos.

**PALABRAS CLAVE:** *Anticuerpos anti-colágeno tipo II, anti-péptido cíclico citrulinizado, anti-sinovial, Artritis Reumatoide.*

### ABSTRACT

*Between the Autoimmune Diseases, Rheumatoid Arthritis (RA) is one of the most studied, due to its high prevalence. Several studies have reported as possible shooting mechanism the existence of an immune response against Collagen type II. The present work look for contributing to the knowledge and meaning of the autoimmune process through determinations of different serum antibodies in subjects with Rheumatoid Arthritis (diagnosed under the American College of Rheumatology criteria) and in subjects with unspecific arthralgia in comparison with normal subjects. For this purpose, a transversal descriptive study was carried out, determining the presence of anti-collagen type II antibodies, anti-CCP*

*(Citrullinated Cyclic Peptides) antibodies and anti-synovial antibodies by indirect immunofluorescence (IFI) in sera, using previously standardized methods according to conventional procedures. No significant differences was found between the averages of the levels of anti-collagen type II in the 3 groups; however, the distribution of the antibody titles shows, in the three groups, curves of frequency of a bi-modal type, with profiles totally different between them. In this order, inside the group with Rheumatoid Arthritis it was identified a subgroup formed by the 20% of the subjects that presents very high levels of anti-collagen type II Antibodies (over the two standard deviations), made by young adults (average age 41 years) that did not receive immunosuppressive treatment.*

*It was not found relationship between the levels of anti-collagen type II antibodies, anti-CCP antibodies and anti-synovial antibodies. The significance of these findings is discussed.*

**KEYWORDS:** *Anti-collagen type II antibody, anti-cyclic citrullinated peptides antibody, anti-synovial antibody, Rheumatoid Arthritis.*

## INTRODUCCION

Las enfermedades autoinmunes afectan aproximadamente al 5 % de la población y comprenden un grupo heterogéneo de enfermedades de las que, por ser multifactoriales, no se conoce de manera clara su etiología. Entre los procesos autoinmunes más frecuentes destacan las llamadas "Enfermedades del Colágeno" caracterizadas por procesos exacerbados de fibrosis que se instalan como efecto de una respuesta autoinmune dirigida contra estructuras que conforman el tejido conectivo, en el que la principal y más abundante proteína es el colágeno. Entre estas enfermedades la más frecuente y mas estudiada es la Artritis Reumatoide (AR) cuya prevalencia es del 1% a nivel mundial (13). En esta patología se ha descrito la existencia de una respuesta inmune contra el Colágeno tipo II, molécula que sería el principal auto-antígeno gatillante para instalar un proceso de hipersensibilidad. Tal hecho ha sido evidenciado en varios estudios tanto en pacientes con AR, en los que se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra el Colágeno tipo II en suero y en fluido sinovial (3,5,9,10,11,25,39,40,43), como en modelos experimentales animales tales como la Artritis Inducida por Colágeno (CIA) (16,17,18,24,28,32,42,48) o la Artritis inducida por Anticuerpos anti-Colágeno tipo II (AIAC) (19,26,34,42). Los ratones con CIA han sido una fuente importante de numerosos estudios; en varios de ellos se han usado anticuerpos monoclonales que reconocen estructuras específicas del Colágeno tipo II nativo y que no reconocen colágeno tipo II desnaturalizado (12,37).

No obstante lo anterior, aun no está claro el papel de estos auto-anticuerpos en la etiopatogenia (27), en la evolución, ni en el pronóstico de los procesos artríticos, hecho que se asocia a la multifactorialidad y a la gran variabilidad de los eventos concurrentes a lo largo del curso de la enfermedad. También deben considerarse que no en todos los casos de AR se desencadena el proceso fibrótico o el de daño en el cartílago articular.

Por otra parte, se han encontrado auto-anticuerpos dirigidos contra nuevas 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 nuevos epítopes moleculares del colágeno y de la membrana sinovial articular (21). Existen fuertes evidencias que muestran a estos anticuerpos como marcadores tempranos de diagnostico y pronostico de Artritis Reumatoide (20, 44, 45, 46,47).

El presente trabajo busca contribuir al conocimiento de la significación de este tipo de auto-anticuerpos presentes en este proceso. Para esto, se realizó la determinación del perfil de la respuesta de auto-anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo, anti-membrana sinovial y anti-péptido cíclico citrulinizado en el suero de sujetos con Artritis Reumatoide (AR), de sujetos con artropatías inespecíficas y de sujetos aparentemente normales, en los que se exploró también la correlación entre los mismos y con diferentes variables asociadas.

**HIPOTESIS:** El perfil de distribución de los niveles de auto-anticuerpos es diferente en los sujetos con Artritis Reumatoide y los que cursan con artropatías inespecíficas.

## **OBJETIVOS:**

### **OBJETIVO GENERAL.**

Determinar el perfil de distribución de los niveles de la respuesta de auto-anticuerpos en sujetos con Artritis Reumatoide y en sujetos con artropatías inespecíficas.

### **OBJETIVO ESPECIFICOS.**

- Determinar la magnitud de la presencia de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo y anti-peptido cítrico citrulinizado en sujetos sanos, en sujetos con Artritis Reumatoide y en sujetos con Artropatías inespecíficas.
- Evaluar la presencia de anticuerpos anti-membrana sinovial tanto en los sujetos normales como en los que cursan con artropatías reumáticas y no reumáticas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Población y Muestra.**

Se realizó un estudio descriptivo y transversal, con los sueros de pacientes que asistieron al Instituto de Servicios de Laboratorio y de Diagnostico e Investigación en Salud – SELADIS, solicitando diversos exámenes de laboratorio y que ya contaban con diagnóstico. Esta población comprendió tres grupos de sujetos entre 18 y 70 años de edad: Sujetos con Artritis Reumatoide (N=40); sujetos con artralgias inespecíficas (N=32) y sujetos control (N=41). La indagación clínica y el consentimiento informado para la utilización de su suero, fueron realizados a tiempo de realizar la toma de muestras.

### **Criterios de Inclusión y de Exclusión.**

El primer grupo consistió en: pacientes diagnosticados con AR por médico especialista bajo los criterios del American College of Rheumatology (Arnett FC. Et al, 1988) y/o por la presencia de Anticuerpos Anti-CCP “positivo” en suero y ausencia de otra patología detectable clínicamente.

El segundo grupo: sujetos con artralgias inespecíficas, incluyo a los que reportaron dolor articular casual o eventual que no cumplía con los criterios del American College of Rheumatology y ausencia de anticuerpos Anti-CCP (negativo) en suero. Se excluyeron sujetos con artropatías de otro origen.

El grupo control fue conformado por sujetos sin patología evidente durante este estudio (aparentemente sanos), sin antecedentes de artralgias recurrentes y en ausencia de infección reciente o concomitante.

### **Determinación de Anticuerpos Anti-Colágeno tipo II por ELISA.**

*Obtención y preparación del colágeno tipo II:* El colágeno fue extraído de cartílago de tabique nasal bovino según el procedimiento descrito por Weir (49); brevemente: el cartílago fue pulverizado por trituración después de su congelación con nitrógeno líquido (Carrera de Física – UMSA) en combinación con hielo seco (Praxair S.A.), logrando una temperatura aproximada de  $-120^{\circ}\text{C}$ , para remover proteoglicanos; la fracción de polvo seco fue re-suspendida en 5 volúmenes de Clorhidrato de Guanidina 4M (p/v) (SIGMA, Aldrich Corp.), en medio amortiguador de Tris 0.05 M, pH7.5. Se incubo a  $4^{\circ}\text{C}$ , se centrifugó a 2000 g. (14000 r.p.m.) por una hora a  $4^{\circ}\text{C}$  y se lavó con ácido acético 0.5 M. La suspensión se centrifugó a 14000 r.p.m., para su posterior digestión con Pepsina en una relación cartílago/pepsina de 50:1 (SIGMA Aldrich Corp.). Se precipitó el colágeno tipo II por adición gradual de NaCl, Los fragmentos de la digestión péptica se eliminaron por diálisis exhaustiva de la suspensión contra ácido acético 0.5 M. El líquido que se obtuvo en la endodíalisis fue liofilizado y conservado en refrigeración a  $20^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso. Se determinó la concentración de colágeno tipo II por peso seco y se realizó una curva con Rojo Ponceau (absorbancia a 560 nm), la que permitió determinar la concentración de colágeno en las preparaciones sucesivas del producto.

El pegado del antígeno a la placa de 96 pozos se realizó adicionando a cada pozo una suspensión de colágeno tipo II a una concentración de  $2\ \mu\text{g/ml}$  (52) en Tris ClNa (Tris: 0.05 M; ClNa: 0.2 M) a pH 7.4, para ser incubados a  $4^{\circ}\text{C}$  por una noche. Se lavó 5 veces con PBS 0.15 M, pH 7,4. El bloqueo de espacios libres fue efectuado mediante la adición PBS/caseína 2% (p/v) (Leche Morinaga con alto contenido de caseína), incubando por 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ , dos veces. El exceso de reactantes fue removido mediante lavado con PBS/Tween 20 al 0,05%, 5 veces. La reacción antígeno anticuerpo fue llevada a cabo

por adición de suero a dilución 1:100 (100  $\mu$ l por pozo). El revelado de los anticuerpos reactantes se realizó por incubación con IgG de Cabra, anti Fc-IgG humana acoplada a Peroxidasa de Rábano (INC Pharmaceuticals, Inc), a una dilución 1:32,000 (previamente normalizada), adicionando 200  $\mu$ l/pozo e incubando por una hora a 37°C. A la mezcla se adicionó 100  $\mu$ l/pozo del co-sustrato 3,3',5,5'tetrametilbenzidina (TMB Trinity) y del sustrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por 15 minutos, a temperatura ambiente. La reacción se paró por adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.13M (Trinity), en un volumen de 100  $\mu$ l/pozo. Se determinó el título midiendo las absorbancias (D.O.) en un lector de placas ELISA multi-pozo (Avareness), a 450 nm – 630 nm.

Como control negativo se usó suero libre de anticuerpos anti-colágeno, el mismo que se preparó a través de absorciones seriadas de sueros de sujetos normales (en los que inicialmente en ningún caso se encontró negatividad con absorbancia cero); para esto, el colágeno tipo II nativo a una concentración óptima de 100  $\mu$ g/ml, se adicionó a placas multipozo en una solución de Tris NaCl (Tris: 0.05 M; NaCl: 0.2 M), a pH 7,4 para ser pegado por incubación a 4°C por una noche. Los pozos se lavaron con PBS 0,15 M, pH 7,4 y posteriormente se incubó cada uno con un volumen de 100  $\mu$ l de un pool "normal" de sueros, durante 12 horas a temperatura ambiente, con leve agitación. Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a otros pozos pegados con antígeno, repitiendo el proceso (reabsorción) hasta que el sobrenadante mostró una reacción negativa para anticuerpos anti-colágeno. Este se guardó a -20°C hasta su uso.

#### **Determinación de Anticuerpos Anti-CCP por ELISA.**

La citrulinización es un proceso enzimático que sucede en la articulación por el cual residuos de arginina se convierten a residuos de citrulina mediante una modificación por de-imidación post-transcripcional, modulada por una enzima Ca<sup>++</sup> dependiente: la Peptidil Arginin de-imidasa (PAD). Este proceso se lleva a cabo en proteínas presentes en las estructuras articulares y se identifica como el posible mecanismo de la inducción de autoinmunidad en las células T CD4<sup>+</sup> en los sujetos que sufren procesos

autoinmunes, como la Artritis Reumatoide (AR). Así, la presencia de anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinizado es considerada como un marcador temprano de la enfermedad, siendo su detección un procedimiento caracterizado por su alta sensibilidad y especificidad (4, 6, 20, 45, 47).

Para la determinación de Anticuerpos Anti-péptido Cíclico Citrulinizado (Anti-CCP) se usó un Kit Comercial validado y certificado (*Inmunoscan RA*, catálogo N° RA 96-RT, Euro-Diagnóstica) y se procedió de acuerdo a instrucciones del fabricante. Los resultados se expresaron como Unidades Internacionales (UI/mL).

#### **Determinación de Anticuerpos Anti-membrana Sinovial por Inmunofluorescencia Indirecta.**

Un fragmento de tejido sinovial articular humano, fue obtenido de un paciente que se sometió a reemplazo de la articulación de la cadera, para recibir una prótesis. La biopsia fue obtenida según técnicas quirúrgicas convencionales y se guardó en un frasco con PBS estéril a -20°C.

Mediante lavado exhaustivo con buffer de acetatos se eliminaron las inmunoglobulinas de depósito en el tejido sinovial. El suero control negativo fue exento de anticuerpos anti-sinovial a través de procedimientos sucesivos de absorción por incubación, a temperatura ambiente, con fragmentos de tejido articular. La muestra de tejido sinovial fue procesada con micrótopo de congelación para obtener cortes con un grosor de 5  $\mu$ m; estos fueron adheridos sobre portaobjetos por cambio brusco de temperatura (de 4°C a temperatura ambiente), dejándolos en cámara húmeda por 1 hora. Para eliminar restos de Inmunoglobulinas tisulares (que podrían dar fluorescencia inespecífica en la IFI) se procedió al lavado con PBS por 40 veces; el corte fue secado y fijado con metanol-acetona (v:v) por 30 minutos, evitando que el tejido se seque. Los cortes se incubaron con 30  $\mu$ l de suero de sujetos en estudio, a una dilución de 1:20 por 30 minutos, a 37°C. y se revelaron por incubación con 30  $\mu$ l de un conjugado de Ig anti-inmunoglobulina humana marcada con Iso-tiocianato de Fluoresceína (MP Biomedicals) a una dilución de 1:200 en PBS, por 30 minutos a 37°C. Para la tinción de contraste se adicionó Azul de Evans, por 5 minutos. La observación al microscopio de fluorescencia fue

efectuado dentro de los treinta minutos después del último lavado. Los resultados se expresan como ausencia o presencia de fluorescencia, evaluada en su intensidad en una escala arbitraria de 0 a 6; la misma que fue definida previamente por observación de cortes de tejido articular a los que se adiciono suero de sujetos con AR que dieron positividad, a diferentes diluciones. La presencia de fluorescencia inespecífica fue calificada con el valor de 1 y la máxima intensidad de fluorescencia con el valor de 6.

### Análisis Estadístico

El Test Kruskal-Wallis fue usado para comparar los grupos de estudio. La *t* de student fue determinada para examinar diferencias entre los grupos (modos) encontrados en los perfiles de distribución de los sujetos de estudio. *p* menores de 0.05 fueron consideradas estadísticamente significativas. Se utilizó regresión lineal para conocer la correlación entre los grupos de estudio. Se aplicó el programa estadístico SPSS 12.0 de Windows para la realización de los gráficos, en los que construyeron las curvas de densidad-frecuencia (Paquete estadístico SPSS, versión 12.0).

## RESULTADOS

### Caracterización de los Grupos de Estudio.

La tabla 1 muestra que los promedios de edad de los grupos de Sujetos con Artritis Reumatoide y de los sujetos con Artralgias Inespecíficas son muy similares ( $42,5 \pm 15.03$  y  $48 \pm 13.7$ , respectivamente); en cambio, los sujetos normales pertenecen a un grupo más joven:  $27,7 \pm 7,9$ . La mayor parte de los sujetos examinados en los dos grupos de pacientes corresponden al sexo femenino (90% y 81%). Esta proporción guarda relación etaria de artropatías con la población general, por lo que se mantuvo la misma en el

grupo de sujetos normales (80%).

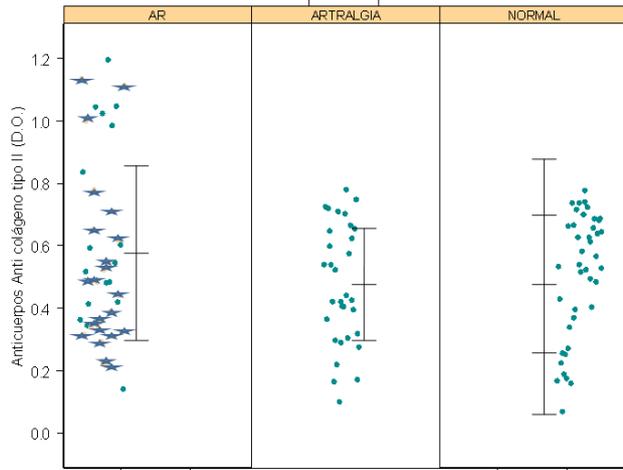
### La Respuesta Humoral Contra Colágeno Tipo II Nativo.

El promedio de los títulos (D.O.) de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo en los sueros de los tres grupos de estudio muestran muy poca diferencia: en el grupo de pacientes con Artritis Reumatoide fue de  $0.577 \pm 0.288$ , en el grupo de pacientes que sufren dolores articulares inespecíficos no compatible con Artritis Reumatoide fue de  $0.473 \pm 0.192$  y el grupo de sujetos normales mostró un promedio de  $0,506 \pm 0,199$  (Tabla 1). Sin embargo, exhibiendo los valores de cada sujeto en los tres grupos (Figura 1), se pudo observar los siguientes eventos: 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 sobrepasan una desviación estándar (D.S.); entre estos, hay sujetos con niveles que sobrepasan las dos D.S. 8/40 (20%). Este subgrupo de pacientes está conformado por adultos relativamente jóvenes (edad promedio 41 años). También se pudo notar que en este grupo de pacientes con AR hay sujetos con niveles bajos de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo. En los pacientes con artralgias no compatibles con AR, 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 sujetos normales se observa también la presencia de anticuerpos anti-colágeno tipo II con un promedio cercano al de los artríticos pero con gran dispersión de los valores de los títulos: en algunos casos con niveles que sobrepasan una desviación estándar (6/41 =14.5%), aunque no existen sujetos con valores mayores a las dos desviaciones estándar, como ocurre en el grupo de sujetos con AR.

Tabla 1 . Características de 72 pacientes con algún tipo de artralgias y sujetos normales en estudio (41).

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

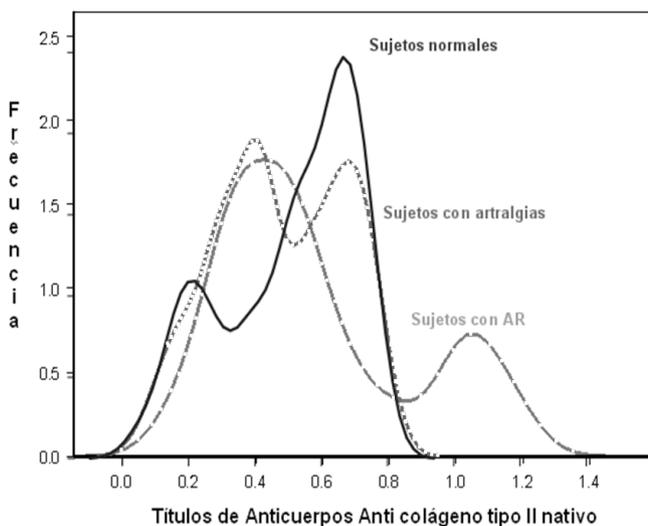
**Figura 1. Determinación de Anticuerpos Anti-colágeno tipo II nativo, en los tres grupos de estudio (Artritis Reumatoide, Artralgias inespecíficas y normales)**



- \* Pacientes con Anticuerpos Anti CCP (+).
- Pacientes con Anticuerpos Anti CCP (-).

La figura 2 muestra la existencia, en todos los grupos, de una distribución bi-modal de los títulos, cuyo perfil es significativamente diferente entre ellos, tanto en valores de frecuencia como en amplitud y ubicación. Esta figura permite destacar: la existencia de un pico de valores elevados en los sujetos con Artritis Reumatoide, la coincidencia de ubicación entre los picos de títulos más bajos de los sujetos con Artritis Reumatoide y de los sujetos con Artralgias Inespecíficas; también resalta la sobre-posición del pico de títulos altos de los sujetos normales con el de los pacientes con artritis inespecíficas.

**Figura 2. Distribución de frecuencias de los resultados serológicos en los tres grupos de estudio.**



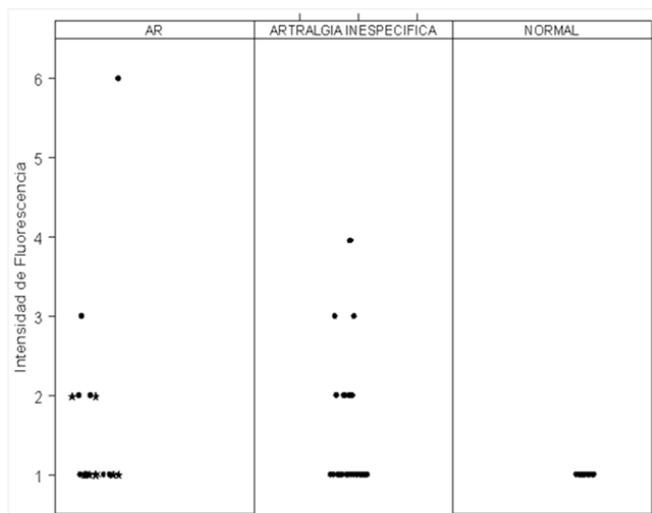
## Determinación de la Presencia y Niveles de Anticuerpos Anti-sinovial.

El tejido sinovial es el principal blanco de inflamación en la Artritis Reumatoide; esta se expresa como un proceso de daño articular que es el resultado de una hipersensibilidad tipo III causada por el depósito de complejos inmunes y que se denomina sinovitis. En este trabajo se exploró la posibilidad de que, además de los fenómenos autoinmunes ya conocidos en la Artritis Reumatoide (complejos IgM Anti-IgG, reacción IgG anti-CCP e IgG anti-colágeno tipo II de cartílago articular), se induzca, durante el fenómeno inflamatorio, la exposición de auto-antígenos, que desencadene una respuesta autoinmune contra estructuras de la membrana sinovial, con la producción de anticuerpos anti-sinovial (hipersensibilidad tipo II) y, tal vez, la formación de nuevos complejos inmunes (hipersensibilidad tipo III). La figura 3 muestra que solo en los pacientes con AR o con AI existen sujetos con anticuerpos anti-membrana sinovial. Sin embargo, los títulos tienen una distribución amplia, detectándose solo en pacientes con Artritis Reumatoide la existencia de Anticuerpos Anti-sinovial con altos títulos 7/33 (21%), siendo una persona de este grupo la que presenta la mayor intensidad de fluorescencia (++), corresponde a una Artritis Reumatoide crónica. En los pacientes con artralgias inespecíficas también se detectaron anticuerpos anti-sinovial pero en títulos menores. En los sujetos normales, ninguno sujeto mostró anticuerpos anti-sinovial.

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

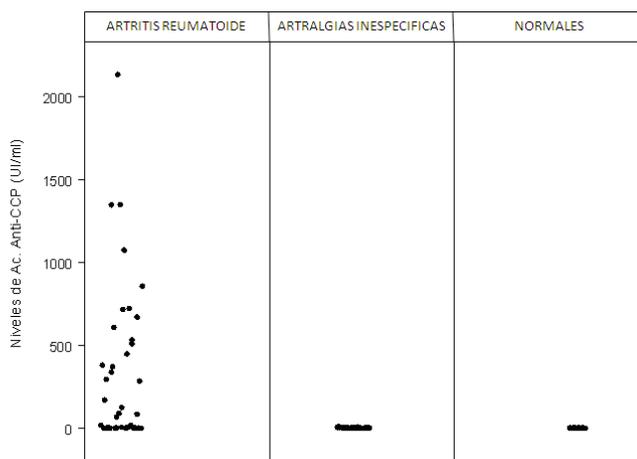
En la figura 4 se observan los títulos de anticuerpos Anti-CCP en los tres grupos de estudio. En los pacientes con Artritis Reumatoide de una población de 40 sujetos estudiados solo 22 (55%) presentaron positividad para Anticuerpos Anti-CCP. En los Pacientes con Artralgias inespecíficas no compatibles con Artritis Reumatoide y en las personas aparentemente sanas, ninguno presentó anticuerpos Anti-CCP. Lo anterior muestra que este marcador es altamente específico pero poco sensible. Por otro lado, se pudo observar que los niveles de anticuerpos anti-CCP fueron muy

**Figura 3. Determinación de anticuerpos anti-membrana sinovial en los tres grupos de estudio, incluyendo a los normales.**



\* Pacientes con Anticuerpos Anti CCP (+).  
 · Pacientes con Anticuerpos Anti CCP (-).  
 1 = Negativo. 2 = Rastros. 3 = (+). 4 = (++) . 5 = (+++) . 6 = (++++).

**Figura 4. Determinación de Anticuerpos Anti- CCP, en los tres grupos de estudio (Artritis Reumatoide, Artralgias no compatibles con Artritis Reumatoide y sujetos aparentemente sanos)**



variados en los sujetos estudiados (entre 25 UI/ml y 2130 UI/ml). El promedio en los artríticos (excluyendo a los anti-CCP negativos) es de 329.7UI/ml con una desviación estándar de 477.85.

## DISCUSION

Los procesos autoinmunes caracterizados por la afectación del aparato locomotor incluyen, entre sus componentes patogénicos, la existencia de fenómenos fibrosantes e inflamatorios 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 ((5, 13, 23, 38, 40). En el caso de las artropatías, particularmente en la Artritis Reumatoide, este componente autoinmune aún no ha sido dilucidado en toda su magnitud. Sobre esta base, en este trabajo se han efectuado procedimientos de análisis inmunológico que condujeron a la exploración de la respuesta de anticuerpos contra diferentes auto-antígenos de la estructura articular. En este orden, en una primera instancia se procedió a desarrollar y validar las técnicas de ELISA contra colágeno tipo II y contra antígenos citrulinizados así como la Inmunofluorescencia Indirecta contra tejido sinovial.

Una vez establecido lo anterior se exploraron los niveles de autoanticuerpos en los sujetos seleccionados, Fue llamativo encontrar que en las tres poblaciones existían sueros positivos y negativos para anticuerpos anti-colágeno tipo II, aunque los primeros se encontraban en mayor proporción en los artríticos. El promedio de los títulos (absorbancia) era similar en los tres grupos, lo que parecía indicar, en principio, que los niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II y su presencia no guardaban relación con la patogénesis de 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 diferencias importantes entre los grupos. Así, se pudo ver que solo en el grupo de los sujetos con Artritis Reumatoide existen sujetos con altos títulos, los cuales sobrepasan las dos desviaciones estándar del promedio de los sujetos normales, resultados similares a los encontrados por Rowley M. (33); en cambio, la presencia de títulos altos no fue observada en los sujetos con artralgias inespecíficas. Lo anterior permitió observar 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 artralgias inespecíficas. Para poner en evidencia este hecho, se elaboraron curvas de frecuencia (paquete estadístico SPSS, versión 12.0). En estas curvas (Figura 2) los sujetos clínicamente normales mostraron una distribución bi-modal que consistía en un modo pequeño de títulos bajos (pico alrededor de 0.2 de D.O.) y un

modo más amplio y alto de títulos mayores, con un pico alrededor de 0.66 de D.O. Este hecho sugería la existencia de dos poblaciones estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) de las cuales, la primera pareciera corresponder a los sujetos enteramente sanos cuyos títulos pueden considerarse como la expresión de 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, es interesante hacer notar que, en la anamnesis fueron precisamente estos sujetos aquellos que reportaron artralgias eventuales asociadas con episodios de enfriamiento de las extremidades (“humedad o frío ambiental importante”), aunque al momento de la toma de muestra estaban exentos de patologías clínicamente evidentes.

En el caso de los sujetos con Artritis Reumatoide, también se encontró una curva bi-modal cuyo primer modo está alrededor de 0.441 D.O. y el segundo modo alrededor de 1.014 D.O. Analizando estadísticamente ambos modos, estos mostraban la existencia de dos poblaciones significativamente diferentes ( $p < 0.001$ ): la de título menor, ubicada en los mismos rangos del modo menor de los sujetos con Artralgias Inespecíficas, y la del modo de títulos considerablemente altos, que no tenía relación con ningún otro subgrupo.

El mismo tratamiento estadístico para los títulos de sujetos con Artralgias Inespecíficas mostró también una curva bi-modal 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 (títulos bajos) de los sujetos con Artritis Reumatoide, el otro modo, de títulos mayores, era muy similar al segundo modo (títulos altos) de los sujetos normales (Figura 2).

Lo anterior puede interpretarse como la existencia de poblaciones con diferentes grados de respuesta que se expresa en agrupamientos de los títulos. Destaca el hecho de que en el grupo de sujetos normales y en el de los que tienen artralgias inespecíficas existen casos que conforman un subgrupo con títulos altos (segundo modo de ambos grupos), pero en ningún caso con títulos iguales o mayores a los del subgrupo de valores considerablemente elevados existentes solo entre los sujetos con Artritis Reumatoide. Estos

subgrupos pudieran ser el reflejo de la existencia de sujetos predispuestos que, obviamente, no se los visualiza en el grupo de los sujetos con Artritis Reumatoide. De la misma forma, en los sujetos con Artritis Reumatoide y con Artralgias Inespecíficas el primer modo, de títulos intermedios (que no se hace evidente en los sujetos normales) pudiera significar la existencia de una población con la patología en curso, cuyo bajo título en suero se explicara por la existencia de cantidades importantes de anticuerpos depositados (adsorbidos) en el sitio de afectación.

El último subgrupo, el de valores más elevados, que aparece exclusivamente en los sujetos con Artritis Reumatoide, parece ser una característica propia de ciertos sujetos con alta reactividad artritogénica. Interesantemente, se pudo encontrar que estos sujetos correspondían precisamente a aquellos en cuya evolución y tratamiento no se incluye el manejo de fármacos inmunosupresores. Esto sugiere, por tanto, que los sujetos con Artritis Reumatoide incorporados en el pico de títulos intermedios son precisamente aquellos que han recibido tratamiento inmunosupresor y no alcanzaron a tener títulos elevados o que, si los tuvieron, retornaron a los niveles intermedios, pero en ningún caso a la normalidad.

La presencia de efectores autoinmunes contra otras estructuras de los tejidos articulares en el proceso artritogénico ha sido planteada por diferentes autores (23), particularmente en modelos experimentales (8). En patología humana no se ha reportado fehacientemente la presencia de este tipo de anticuerpos o de células T, siendo más bien de importancia destacada los complejos inmunes contra otros antígenos tanto de origen endógeno (IgG, DNA, etc.) como exógeno (estructuras virales o bacterianas) (15,29), los cuales se depositarían en la sinovial articular en el marco del mecanismo de la Hipersensibilidad tipo III (complejos inmunes); en estos casos el tejido viene a ser un “blanco inocente”. En el trabajo presente se propuso la búsqueda de anticuerpos dirigidos contra otras estructuras articulares autólogas, por Inmunofluorescencia Indirecta. Para esto, fue importante desarrollar procesos de estandarización de los procedimientos, en la intención de lograr resultados que eviten, en lo posible, la aparición de resultados falsos

positivos y falsos negativos. Los resultados de la investigación de auto-anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta muestran que tanto en los grupos de sujetos con artritis reumatoide como en sujetos con artralgiás inespecíficas se presentan casos con evidente reactividad demostrada por imágenes inmunofluorescentes positivas para algunas estructuras. Sin embargo, estas son ostensiblemente más evidentes y se presentan en mayor número y con títulos más altos en sujetos con Artritis Reumatoide (21%).

Por otra parte, se conoce que la determinación de anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinizado (anti-CCP) tiene un importante valor diagnóstico (4,6 20,31); sobre esta base, se propuso, en principio, utilizar esta técnica para la selección de los sujetos de estudio. Diversos autores reportan una importante especificidad de los anticuerpos Anti-CCP para el diagnóstico de Artritis Reumatoide; en general ésta es mayor a 89% (6, 14, 22, 30, 35, 36, 38, 41, 44, 45). Llamativamente, esta *especificidad* es evidente, no obstante que: a) existan otras patologías inflamatorias de naturaleza similar que, en muchas ocasiones, involucren a los tejidos articulares (4), b) que la citrulinización un fenómeno dependiente de la existencia de enzimas que se expresan como efecto de la existencia de diversas señales inflamatorias (TNF  $\alpha$ , IL-1), y c) que este proceso bioquímico 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 (6, 14, 30, 35, 36, 38, 41). En nuestro trabajo hemos encontrado que, de los pacientes que presentaban signo-sintomatología propia de la Artritis Reumatoide, según los criterios del American College of Rheumatology, solo el 55% dieron resultados positivos para este bio-marcador (títulos mayores a 25 UI/ml); estos resultados son similares a los reportados por Raza K. et al.(31). Por lo anterior, todos los sujetos anti-CCP positivos fueron incorporados en el grupo de Artritis Reumatoide, sean o no compatibles con los criterios del American College of Rheumatology); en este sentido y según este criterio, los sujetos con artritis inespecíficas y los testigos normales fueron siempre negativos.

Un análisis de correlación, mostró que no existen

datos positivos (por regresión lineal) si se comparan los títulos entre los tres tipos de auto-anticuerpos, en los tres grupos (datos no mostrados). Así, a modo de ejemplificar este hecho, dos pacientes del grupo de los sujetos con AR son los que presentan la mayor intensidad de fluorescencia (++) en los anticuerpos anti-sinovial, pero una de estos corresponde a una Artritis Reumatoide con sero-negatividad para anticuerpos anti-CCP y el otro es una Artritis Reumatoide crónica.

Tampoco se encontró correlación entre los títulos anti-Colágeno tipo II y el antecedente de la ingesta de cartílago en la dieta, tal como se propusiera en estudios anteriores (11,33).

## CONCLUSIONES

Los resultados reportados permiten concluir que:

- a) Existen anticuerpos anti-colágeno tipo II en suero tanto en sujetos artríticos como en sujetos normales.
- b) Los niveles de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo en los tres grupos estudiados, incluyendo los normales, presentan diferentes curvas de distribución bi-modal. En los sujetos normales existe un pico de títulos bajos y otro de títulos altos, en los sujetos con artralgiás 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".
- c) El subgrupo de sujetos con Artritis Reumatoide que se incluye en el pico de los niveles muy elevados de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo, está conformado solo por los individuos que no recibieron tratamiento inmunosupresor. *Por lo anterior, la existencia de los niveles elevados de anticuerpos anti-colágeno tipo II nativo podría constituirse en un predictor temprano de la instalación y de la evolución de la Artritis Reumatoide en sujetos que no reciben tratamiento inmunosupresor*
- d) Por existir anticuerpos anti-colágeno tipo II en sujetos normales, no fue posible proponer un punto de corte (cut off) que distinga la población normal de la que está desarrollando eventos inmunopatológicos artritogénicos. Sin embargo, puede afirmarse que, en el estudio presente, según la figura 2, la D.O. de 3.0

parece constituir el límite entre la población completamente normal y la que tiene en curso procesos autoinmunes con perspectiva de instalar cuadros clínicos de artritis.

- e) De todos modos, queda claro que es necesario realizar un estudio de cohorte de los diferentes grupos de estudio para conocer, por la dinámica de cambio que se presente, el papel de los anticuerpos anti-colágeno tipo II en la inmunopatología de la Artritis Reumatoide y en las posibilidades de su uso como marcador predictivo o de efectividad terapéutica.

- f) No existe correlación entre los títulos de los tres tipos de auto-anticuerpos en ninguno de los grupos de estudio.

### Agradecimientos

Se reconoce la colaboración y apoyo de la Dra. Katty Terrazas, la Dra. Patricia Terceros de la Unidad de Virología y de Dra. Silvia Zambrana de la Unidad de Biomedicina Experimental del Instituto SELADIS.

### REFERENCIAS

1. Andersson M., Cremer MA., Terato K., Burkhardt H., Holmdahi R. Analysis of type II collagen reactive T cells in the mouse. II. Different localization of immunodominant T cell epitopes on heterologous and autologous type II collagen. (1991). *Scand J. Immunol.* 33: 505.
2. Andersson M., Holmdahi R. Analysis of type II collagen – reactive T cells in the mouse. I. Different regulation of autoreactive non autoreactive anti – type II collagen T cells en thDBA/1 mouse. *J. Immunology*(1990).20: 1061.
3. Andriopoulos NA, Mestecky J, Miller EJ, Bradley EL:Antibodies to native and denatured collagens in sera of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* (1976)19:613-617.
4. Avoac J, Gossec L, Dougados M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann RheumDis*;(2006). 65:845–851.
5. Beard HK, Ryvar R, Skingle J, Greenbury CL: Anticollagen antibodies in sera from rheumatoid arthritis patients. *J Clin Pathol* (1980) 30:1077-1081.
6. 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.*
7. Burkhardt H, Hu“ffmeier U, Spriewald B, Bo“hm B, Rau R, Kallert S, Engstro“m A, Holmdahl R, Reis A. 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* (2006). Vol. 54, No. 1, January, pp 82–89.
8. Cho Y, Cho M, Min S, Kim H. Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews*(2007), 7: 65-70.
9. Clague RB, Shaw MJ, Holt PJJ Incidence of serum antibodies to native type I and type II collagens in patients with inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis.*(1980): 39: 201 – 206.
10. Clague RB, Shaw MJ, Holt PJJ Incidence and correlation between serum IgG and IgM antibodies to native type I1 collagen in patients with chronic inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*(1981): 40:6-10.
11. Collier DH, Kerwar SS, Garovoy MR, Fye KH, Stobo JD Anticollagen antibodies and immune response gene products in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* (1984):27~1201-1209.
12. Cook A, Gray R, Ramshaw J, Mackay I. y Rowley M. Antibodies against the CB10 fragment of type II collagen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, (2004). 6:R477-R483.
13. Cooper GS, Stroehla BC. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* May(2003); 2(3):119-25.
14. 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. Rheumatoid arthritis associated autoantibodies in patients with synovitis of recent onset. *Arthritis Res*;2(3):236-43. Epub 2000 Mar 31.

15. Gourley M, Miller F. *Mechanisms of Disease: environmental factors in the pathogenesis of rheumatic disease. Nature Clinical Practice Rheumatology.*(2007). March Vol 3. No 3.
16. Griffiths M, Wang J, Joe B, Dracheva S, Kawahito Y, Shepard J, Reese V, McCall-Vining S, Hashiramoto A, Cannon G. *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. (2000). 43: 1278.*
17. Gulko P, Kawahito Y, Remmers E, Reese V, Wang J, Dracheva S, Ge L, Longman R, Shepard J, Cannon G. *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. (1998). 41: 2122.*
18. Jirholt J, Cook A, Emahazion T, Sundvall M, Jansson L, Nordquist N, Pettersson U, Holmdahl R. *Genetic linkage analysis of collagen-induced arthritis in the mouse. Eur. J. Immunol.(1998). 28:3321 – 3328.*
19. Kagari T, Doi H, Shimozato T. *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;(2002). 169: 1459–66.*
20. Kastbom A., Strandberg G., Lindroos A. and Skogh T. *Anti-CCP antibody test predicts the disease course during 3 years in early rheumatoid arthritis (the Swedish TIRA project). Ann Rheum Dis(2004).;63:1085–1089.*
21. Koivula M, Heliovaara M, Ramberg J, Knekt P, Rissanen H, Palosuo T, Risteli J. *Autoantibodies binding to citrullinated peptide of type II collagen and to cyclic citrullinated peptides predict synergistically the development of seropositive rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis(2007). 66:1450–1455.*
22. Lundberg K, Nijenhuis S, Vossenaar ER, Palmblad K, van Venrooij WJ, Klareskog L, Zendman AJ, Harris HE. *Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. Arthritis Research and Therapy(2005). Vol 7, Nro 3.*
23. Mackay I, Rowley M. *Autoimmune epitopes: autoepitopes. Autoimmunity reviews. (2004). 3:487-492.*
24. McIndoe RA, Bohlman B, Chi E, Schuster E, Lindhardt M, Hood L. *Localization of non-Mhc collagen-induced arthritis susceptibility loci in DBA/1j mice. Proc Natl Acad Sci (1999). USA. Mar 2; 96(5):2210-4.*
25. Michaeli D, Fudenberg HH *The incidence and antigenic specificity of antibodies against denatured human collagen in rheumatoid arthritis. Clin Immunol Immunopathol(1974): 2: 153-159.*
26. Miller SD, Vanderlugt C, Smith-Begolka W. *Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. Nat. Med.(1997). 3: 1133 – 1136.*
27. Mullazehi M, Mathsson L, Lampa J, Rönnelid J. *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(2007). 66:537–541.*
28. Müller-Ladner U, Pap T, Gay R, Neidhart M, Gay S. *Mechanisms of Disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. Nature Clinical Practice Rheumatology. (2005). December vol 1 no 2*
29. Perron H, Garson JA, Bedin F. *Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci (1997). USA; 94:7583-8.*
30. Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, Sundin U, van Venrooij WJ. *Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum.(2003). Oct; 48(10):2741-9.*
31. 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.*
32. Remmers E, Longman R, Du Y, O'Hare A, Cannon G, Griffiths M, Wloder R. *A genome scan localizes five non-MHC loci controlling collagen-induced arthritis in rats. Nat. Genet. (1996). 14:82.*
33. Rowley M, Tait B, Mackay I, Cunningham T, Phillips B. *Collagen Antibodies in Rheumatoid Arthritis. Arthritis and Rheumatism. (1986). Vol 29, N<sup>o</sup> 2*
34. Sakaguchi S. (2000). *Cause and etiological mechanism of rheumatic arthritis using animal models. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi 23: 497 – 498.*

35. Schellekens GA, De Jong B, Van der Hoogen F, Van de Putte L, Van Venrooij W. Citrulline is a essential constituent of antigenic determinants recognized by Rheumatoid Arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.*(1998). 101, 273 – 381.
36. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, van Venrooij WJ. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.*(2000). Jan; 43(1):155-63.
37. Schulte S, Unger C, Mo JA, Wendler O, Bauer E, Frischols S, Arthritis-related B cell epitopes in collagen II are conformation-dependent and sterically privileged in accessible sites of cartilage collagen fibrils. *J BiolChem*(1998). 273:1551– 6.
38. Simon M, Girbal E, Sebbag M, Gomès-Daudrix V, Vincent C, Salama G, Serre G. The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called 'antikeratin antibodies,' autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*;(1993). 92:1387–93.
39. Steffen C, Timpl R: Antigenicity of collagen and its application in the serologic investigation of rheumatoid arthritis sera. *Int Arch Allergy Appl Immunol* (1963)22: 333-349.
40. Stuart JM, Huffstutter EH, Townes AS, Kang AH Incidence and specificity of antibodies to types I, II, III, IV, and V collagen in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases as measured by <sup>125</sup>I-radioimmunoassay, *Arthritis Rheum* (1983): 26:832-840,.
41. Suzuki K, Sawada T, Murakami A, Matsui T, Tohma S, Nakazono K, Takemura M, Takasaki Y, Mimori T, Yamamoto K. High diagnostic performance of ELISA detection of antibodies to citrullinated antigens in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*;(2003). 32:197–204.
42. 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.
43. Trentham DE, Kammer GM, McCune WJ, David JR: Autoimmunity to collagen: a shared feature of psoriatic and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*(1981)24: 1363-1369. .
44. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*(2005). Vol 7, Nro 5.
45. Van Gaalen, F. Linn-Rasker S, van Venrooij W, de Jong B, Breedveld F, Verweij C, Toes R, Huizinga T. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to Rheumatoid Arthritis in patients with undifferentiated arthritis. *Arthritis Rheum.*(2004). 50, 709 – 715.
46. Visser H, le Cessie S, Vos K, Breedveld FC, Hazes JM. How to diagnose Rheumatoid Arthritis early? A prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis Rheum.* (2002). 46, 357 – 365.
47. Vossenaar E, van Venrooij W. Anti – CCP antibodies, a highly specific marker for (early) Rheumatoid Arthritis. *Clin. Applied Imm. Rev.*(2004). 4, 239 – 262.
48. Vyacheslav A. Adarichev, Valdez J. C. Combined Autoimmune Models of Arthritis Reveal Shared and Independent Qualitative (Binary) and Quantitative Trait Loci. *The Journal of Immunology.*(2003). 170: 2283 -2292.
49. Weir M. *Handbook of Experimental Immunology*, 5<sup>o</sup> Ed. 1996, ISBN 3 Volume set. Pags 192.5 – 192.6.
50. Yang H, Jirholt J, Svensson L, Sundvall M, Jansson L, Pettersson U, Holmdahl R. Identification of genes controlling collagen – induced arthritis in mice: striking homology with susceptibility loci previously identified in the rat. *J. Immunol.* (1999). 163: 2916.