

ARTRITIS REUMATOIDE: IMPORTANCIA DE LOS ANTIGENOS CITRULINADOS EN EL DIAGNOSTICO DEL PADECIMIENTO

Disney M. Rosales-Borjas, María Alejandra Arévalo, Librado Ortiz-Ortiz

Laboratorio Clínico Bacteriológico del Hospital Dr. Miguel Oraá, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México y Facultad de Medicina, Extensión Portuguesa, Guanare, Venezuela

Recibido Noviembre 4, 2009. Aceptado Noviembre 25, 2009

RHEUMATOID ARTHRITIS: IMPORTANCE OF THE CITRULLINATED ANTIGENS IN THE DIAGNOSES OF THE DISEASE

Resumen

Se hace una revisión de los antígenos y anticuerpos más relevantes involucrados en la patogenia de la artritis reumatoide, así como la importancia de los antígenos citrulinados en el diagnóstico del padecimiento.

PALABRAS CLAVE: *Artritis reumatoide, diagnóstico, autoantígenos, autoanticuerpos, factor reumatoide, antígenos citrulinados*

Abstract

In this brief review, some of the most relevant antigens and antibodies involved in the pathogenesis of the rheumatoid arthritis, as well as the importance of the citrullinated antigens in the diagnosis of the disease, are described.

KEY WORDS: *Rheumatoid arthritis, diagnoses, autoantigens, autoantibodies, rheumatoid factor, citrullinated antigens*

Introducción

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad multisistémica crónica que involucra primariamente las articulaciones. Se caracteriza por una sinovitis inflamatoria, destrucción de las articulaciones, atrofia muscular y devastación ósea. Otras áreas del cuerpo que pueden ser afectadas, incluyen los pulmones, ojos, vasos sanguíneos, y piel. La prevalencia de la AR es de aproximadamente uno por ciento de la población general, con preponderancia tres veces mayor en la mujer (1, 2). Su causa es desconocida. No obstante, se han identificado factores endocrinos, ambientales y genéticos involucrados en el desarrollo de la misma, los cuales son variables de una población a otra (3). En relación a la predisposición genética, en los individuos afectados los alelos del HLA-DR1 y DR4 son los más asociados a la patogénesis de la enfermedad (4).

Autoantígenos y autoanticuerpos involucrados

La AR es una enfermedad sistémica y como tal, no debería pensarse en los componentes de las articulaciones como antígenos responsables del padecimiento; sin embargo, a lo largo de su estudio se han sugerido una variedad de autoantígenos de estas como inductores de la respuesta autoinmune (5). Hasta hace poco la determinación del factor reumatoide (FR), un anticuerpo dirigido contra la fracción constante (Fc) de las inmunoglobulinas de clase IgG, era la única prueba utilizada para el estudio de esta patología, y su presencia es considerada como criterio de clasificación de la enfermedad (2). No obstante, el FR no es altamente sensible (66%), ni específico (87%), y puede encontrarse en otras enfermedades autoinmunes, neoplásicas, infecciones crónicas y aún en personas sanas, particularmente en aquellas de edad avanzada (6, 7).

Otros anticuerpos se han asociado también con la AR, específicamente: (i) anticuerpos antifactor perinuclear (AFP) (8); (ii) anticuerpos antiqueratina (AKA) (9); (iii) anticuerpos anti-Sa (10), cuyo antígeno Sa se ha identificado como un complejo hapteno-acarreador en donde la citrulina es el determinante antigénico (epitopo) y la vimentina es el acarreador (11, 12). Los anticuerpos frente a Sa se han descrito en aproximadamente 40% de pacientes con AR, y en el 50% de pacientes con AR crónica, y en cerca del 25% de pacientes con AR de aparición reciente (13), y (iv) anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados (anti-PCC) de gran sensibilidad (80%) y especificidad (98%) en pacientes con AR (14), los cuales se presentan en etapas tempranas de la enfermedad. El antígeno reconocido por los anticuerpos AFP y AKA es el mismo y corresponde a profilagrina, la cual se expresa en diferentes sustratos (15). Actualmente, estos anticuerpos se denominan anticuerpos antifilagrina o antiprofilagrina (16).

La filagrina es una proteína epidérmica que une los filamentos intermedios de la queratina y promueve la formación de puentes disulfuro entre los filamentos intermedios durante las fases terminales de diferenciación de las células epiteliales de los mamíferos, que es sintetizada como un precursor proteico, la profilagrina, que contiene entre 10 y 12 moléculas de filagrina (17).

La vimentina, un candidato interesante como autoantígeno en la AR, es una proteína fibrosa que forma los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular en particular de células embrionarias, endoteliales, y sanguíneas, que se expresa ampliamente, y que puede estar involucrada principalmente en procesos estructurales, como la cicatrización de heridas. Los macrófagos activados secretan vimentina en el espacio extracelular. La citocina proinflamatoria factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) puede incitar la secreción de vimentina, mientras que la citocina antiinflamatoria interleucina 10 (IL-10), bloquea su secreción (18).

Se han investigado otros autoantígenos de la sinovia, potenciales en la generación de AR, que

puedan disparar la inducción de autoanticuerpos por las células B y respuesta de células T. Entre ellos, se han mencionado a las proteínas de choque térmico, como la BiP que estimula la proliferación de células T CD8⁺ del fluido sinovial de pacientes con AR; se ha sugerido que estas células pueden llevar a cabo un papel regulador en la respuesta normal a la inflamación (19).

Citrulinación de proteínas

Las proteínas, entre ellas las involucradas en la patogenia de la AR, pueden sufrir cambios químicos después de que han sido sintetizadas, lo que se conoce como cambios postraduccionales (CPT). La citrulinación es un CPT que consiste en la conversión del residuo de arginina a citrulina, catalizada por la enzima peptidil arginina deiminasa (PAD) en presencia de calcio (Fig. 1), la cual parece ser controlada hormonalmente (20).

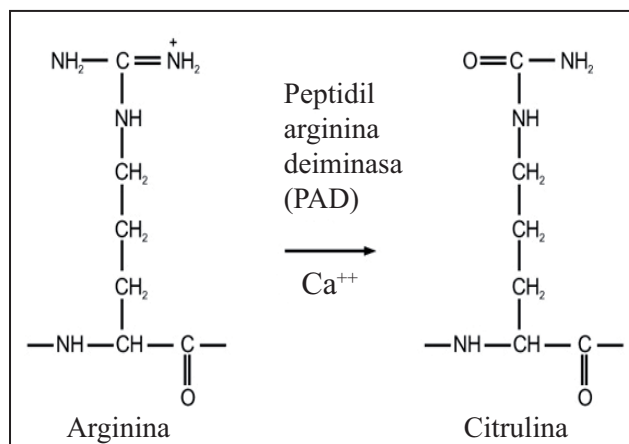


Figura 1. Transformación de la arginina en citrulina catalizada por la enzima PAD.

Estos CPTs ocasionan un pequeño cambio en la masa molecular y la pérdida de una carga positiva, produciendo una modificación en su capacidad de interactuar con proteínas vecinas (21), volviéndola más susceptible a la degradación proteolítica por otras enzimas. Además, pueden tener lugar otras interacciones intermoleculares. No es difícil aceptar que el proceso de citrulinación juegue un papel importante en autoinmunidad. En apoyo de esta hipótesis podemos señalar que otras modificaciones post-traduccionales han sido

implicadas en otras enfermedades autoinmunes: la descarboxilasa del ácido glutámico ha sido asociada con la diabetes mellitus de tipo I (22); la mieloperoxidasa en la vasculitis (23); la gliadina de trigo modificada en la enfermedad celíaca (24), y la piruvato deshidrogenasa en la cirrosis biliar primaria (25).

En el humano se han identificado cinco isoformas de PAD, cuyo perfil de expresión es tejido específico (26). Las PADs en células de mamífero catalizan la deiminación de residuos de arginina enlazados a proteínas, formando citrulina. Dos de estos sustratos para las deaminasas son la filagrina y la tricohialina. La actividad de PAD parece ser influenciada marcadamente por una variedad de compuestos estrogénicos (27). Es de hacer notar que durante la apoptosis algunas proteínas celulares son citrulinadas (28), en particular la citrulinación apoptótica de vimentina (12, 29). La citrulinación baja la carga positiva de la proteína, lo cual puede ocasionar una desestabilización o aún pérdida de interacciones inter o intramoleculares. En la vimentina, la citrulinación puede inducir una casi completa despolimerización, alterando la red del citoesqueleto (30). PAD-2 y PAD-4 son los únicos isotipos que se expresan en el tejido sinovial de pacientes con AR y otras artritis. Las células inflamatorias son la fuente principal, aunque la PAD-4 también se presenta en los sinoviocitos hiperplásicos. Ambos isotipos están probablemente involucrados en la citrulinación de la fibrina (31). Recientemente, la PAD-4 ha sido descrita entre los nuevos neoantígenos de la AR, ya que reacciona con sueros de pacientes con el padecimiento (32).

Respuesta autoinmune

La PAD-2 y PAD-4 actúan sobre las proteínas de la membrana sinovial, como la fibrina y la vimentina, que al citrulinarse se convierten en inmunógeno, generando una respuesta autoinmune mediada por linfocitos B, la cual puede amplificarse en individuos susceptibles, o en presencia de factores ambientales, o neuroendocrinos. Asimismo, existe la posibilidad de una respuesta de linfocitos T

contra péptidos citrulinados, insinuando que la membrana sinovial constituye un órgano blanco de la respuesta autoinmune. Lo anterior sugiere que la citrulinación de proteínas genera alteraciones cuali o cuantitativas que colaboran en la pérdida de la tolerancia inmunológica y en el desarrollo de enfermedad autoinmune (33).

Además, muchos factores ambientales que participan en la aparición de autoinmunidad conllevan a la apoptosis, y durante este proceso muchos autoantígenos son modificados, provocando en las proteínas la exposición de epitopos ocultos o bien creando epitopos nuevos que rompen la tolerancia inmune del organismo, incitando una respuesta autoinmune en individuos susceptibles. Una de estas modificaciones que crea nuevos epitopos puede ser la citrulinación de un autoantígeno no definido y hasta ahora no identificado y que es específico en la AR. La citrulinación apoptótica de la vimentina es importante porque tales modificaciones pueden contribuir a los cambios morfológicos de la célula apoptótica. En el caso de los filamentos de vimentina, la citrulinación puede inducir una casi completa despolimerización, rompiendo la red del citoesqueleto (29).

Especificidad y sensibilidad de los anticuerpos frente a antígenos citrulinados

En estudios clínicos de artritis temprana, se han descubierto anticuerpos contra péptidos citrulinados, de gran especificidad, por lo que pueden constituir un criterio para el diagnóstico de la AR (34). Estos anticuerpos son producidos localmente por las células plasmáticas en la sinovia, y posiblemente son disparados por el sustrato citrulinado que se encuentra en la sinovia de la AR. Es interesante mencionar que las cadenas alfa y beta de la fibrina son proteínas citrulinadas relevantes en el tejido sinovial inflamado, elevando su importancia en la etiología de este padecimiento (35, 36).

Las investigaciones reportadas en la literatura indican que los autoanticuerpos dirigidos frente a proteínas citrulinadas tienen una mayor especificidad para la AR; entre

estos tenemos al factor perinuclear (37), los denominados anticuerpos antikeratina (9, 38), anticuerpos antifilagrina (39), previamente mencionados, los cuales reconocen epitopos que contienen el aminoácido no esencial citrulina. Además de su especificidad, los anti-CCP pueden ser detectados en los estadios tempranos del padecimiento y pueden predecir el resultado de la enfermedad clínica (40). En el líquido sinovial se han encontrado anticuerpos y células plasmáticas formadoras de anticuerpos anticitrulinados en pacientes con AR (41). Considerando que los anticuerpos anticitrulina (anti-CCP y anti-MCV) son muy específicos para AR, podemos especular que estos pueden aportar información acerca de la etiología de este padecimiento, particularmente acerca de la citrulinación de proteínas y de las enzimas que participan en la conversión de la peptidilarginina a peptidilcitrulina.

Se ha reportado la identificación de las dianas epiteliales de varios autoanticuerpos específicamente asociados con la AR, como variante de la (pro) filagrina. Estos dianas corresponden a proteínas deiminadas ("citrulinadas"), de las cuales, como ya se mencionó, sus residuos arginil han sido transformados postraduccionalmente en residuos citrulina por una PAD, y son reconocidos por los autoanticuerpos de manera específica. Estos autoanticuerpos frente a las proteínas citrulinadas (ACPA) son secretados por células plasmáticas del tejido sinovial y su diana principal corresponde a formas citrulinadas de las cadenas alfa y beta de la fibrina, abundantes en el tejido. La síntesis de estos ACPA en el tejido sinovial reumatoide y la existencia en ese sitio de la diana antigénica específica, constituye un fuerte argumento para la participación de este conflicto inmunológico específico en la patofisiología de la AR (42, 43).

Los ACPA muestran una sensibilidad razonable y una especificidad diagnóstica elevada. Estos autoanticuerpos pueden estar presentes al inicio del padecimiento y predicen la artritis erosiva. En consecuencia la incorporación de ACPA como un criterio adicional puede mejorar la certeza de los criterios de la *American College of Rheumatology*, generalmente usada

para la clasificación del padecimiento (44). Cuando se comparo la eficiencia diagnóstica de la determinación de anti-CCP y anti-MCV en pacientes con AR se encontró que eran similares. Sin embargo, un grupo de pacientes con AR que eran negativos para el FR y los anticuerpos anti-CCP, dieron resultados positivos para anti-MCV (44, 45).

Conclusiones

Los factores más importantes para el diagnóstico de la AR son la historia clínica y examen físico del paciente, seguido de los estudios radiográficos. No obstante, si el diagnóstico de AR es considerado, se debe realizar una determinación de FR, aunque el ensayo de anticuerpos citrulinados puede ser de gran utilidad, particularmente en pacientes con un FR negativo y donde el médico busca un apoyo a su diagnóstico. Una prueba positiva de anticuerpos citrulinados en un paciente con sinovitis con o sin FR proporciona un apoyo para el diagnóstico de AR, asociado con un mal pronóstico, y la posibilidad de iniciar un tratamiento más agresivo. Además, estas pruebas de laboratorio son generalmente de gran ayuda para el monitoreo de la toxicidad potencial de los tratamientos de la AR.

Correspondencia: Dr. Librado Ortiz-Ortiz.
e-mail: orlizfl@hotmail.com

Referencias

1. Fauci, A.C. 2009. SLE, RA, and other connective tissue diseases. En, Harrison's Manual of Medicine Principles of Internal Medicine. A.S. Fauci, E. Braunwald, D.L. Kasper, S. Hauser, D. Longo, J. Larry Jameson, J. Loscalzo . 17th Ed. The McGraw-Hill Co. pp. 885-890.
2. Arnett, F.C. Edworthy, S.M., Bloch, D.A., et al. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31:315-324.
3. Anayam J.M. 1999. Genes y artritis reumatoidea. *Rev. Colomb. Reumatol.* 6:240-250.
4. Gregersen, P.K., Silver, J., Winchester, R.J. 1987. The shared epitope hypothesis: An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 30: 1205-1213.
5. Mageed, R.A. RF (rheumatoid factor). 1996. En, Manual

- of Biological Markers of Disease. W.J. van Venrooij, R.N. Maini, Eds. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. pp. 1-27.
6. Lisse, J.R. 1993. Does rheumatoid factor always mean arthritis? *Postgrad. Med.* 94:133-134.
 7. van Venrooij, W.J., Hazes, J.M., Visser, H. 2002. Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *Neth. J. Med.* 60:383-388.
 8. Nienhuis, R.L., Mandema, E. 1964. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 23:302-305.
 9. Young, B.J.J., Mallya, R.K., Leslie, R.D.G., et al. 1979. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br. Med. J.* 2:97-99.
 10. Despres, N., Boire, G., López-Longo, F.J., Menard, H.-A. 1994. The Sa system: a novel antigen-antibody system specific for rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 21:1027-1033.
 11. Menard, H.A., Lapointe, E., Rochdi, M.D., Zhou, S.J. 2000. Insights into rheumatoid arthritis derived from the Sa immune system. *Arthritis Res.* 2:429-432.
 12. Vossenaar, E.R., Després, N., Lapointe, E., et al. 2004. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res. Ther.* 6:R142-R150.
 13. Hayem, G., Chazerain, P., Combe, B., et al. 1999. Anti-Sa antibody in an accurate diagnostic and prognostic marker in adult rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 26:7-13.
 14. Schellekens, G.A., de Jong, B.A.W., van den Hoogen, F.H.J., et al. 1998. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* 101:273-281.
 15. Sebbag, M., Simon, M., Vincent, C., et al. 1995. The antiperinuclear factor and the so called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* 95:2672-2679.
 16. Vincent, C., de Keyser, F., Masson-Bessiere, C., et al. 1999. Anti-perinuclear factor compared with the so called antikeratin antibodies and antibodies to human epidermis filaggrin, in the diagnosis of arthritides. *Ann. Rheum. Dis.* 58:42-48.
 17. Girbal, E., Sebbag, M., Gomesdaudrix, V., et al. 1993. Characterization of the rat esophagus epithelium antigens defined by the so called antikeratin antibodies, specific in recent-onset arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 52:749-757.
 18. Mor-Vaknin, N., Punturieri, A., Sitwala, K., Markovitz, D.M. 2003. Vimentin is secreted by activated macrophages. *Nat. Cell Biol.* 5:59-63.
 19. Bodman-Smith, M.D., Corrigan, V.M., Kemeny, D.M., Panayi, G.S. 2003. BiP, a putative autoantigen in rheumatoid arthritis, stimulates IL-10-producing CD8-positive T cells from normal individuals. *Rheumatology* 42:637-644.
 20. van Venrooij, J., Pruijn, G.J.M. 2000. Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2:249-251.
 21. Tarcsa, E., Marekov, L.N., Mei, G., et al. 1996. Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. *J. Biol. Chem.* 271:30709-30716.
 22. Mendoza, F.M., Curiel, M.O.P., Cárdenas, H.T., et al. 2000. Frequency of glutamic acid decarboxylase autoantibodies in Mexican diabetic children. *Rev. Invest. Clin.* 52:427-431.
 23. Suzuki, K., Okazaki, T. 2004. Contribution of myeloperoxidase in vasculitis development. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57:S2-S3.
 24. Toscano, V., Conti, F.G., Anastasi, E., et al. 2004. Importance of gluten in the induction of endocrine autoantibodies and organ dysfunction in adolescent celiac patients. *Amer. J. Gastroenterol.* 95:1742-1748.
 25. Yuste, J.R., Moreno, D., Melero, I. 2006. Exámenes de sangre. Inmunidad mediada por células. Serología y diagnóstico inmunobiológico. En, *La Clínica y el Laboratorio.* J.M. Prieto Valtueña, 20a. Ed. Masson, Barcelona. pp. 157-200.
 26. Vossenaar, E.R., Zendman, A.J., van Venrooij, W.J., Pruijn, G.J. 2003. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* 25:1106-1118.
 27. Takahara, H., Kusubata, M., Tsuchida, M., et al. 1992. Expression of peptidylarginine deiminase in the epithelial cells of mouse uterine is dependent on estrogen. *J. Biol. Chem.* 267:520-525.
 28. Mizoguchi, M., Manabe, M., Kawamura, Y., et al. 1998. Deimination of 70-kD nuclear protein during epidermal apoptotic events in vitro. *J. Hist. Cytochem.* 46:1303-1310.
 29. Asaga, H., Yamada, M., Senshu, T. 1998. Selective deimination of vimentin in calcium ionophore-induced apoptosis of mouse peritoneal macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 243:641-646.
 30. Inagaki, M., Takahara, H., Nishi, Y., et al. 1989. Ca²⁺ dependent deimination-induced disassembly of intermediate filaments involves specific modifications of the amino-terminal head domain. *J. Biol. Chem.* 254:18119-18127.
 31. Foulquier, C., Sebbag, M., Clavel, C., et al. 2007. Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis Rheum.* 56:3541-3553.
 32. Auger, I., Balandraud, N., Rak, J., et al. 2009. New autoantigens in rheumatoid arthritis (RA): screening 8268 protein arrays with sera from patients with RA. *Ann. Rheum. Dis.* 68:591-594.
 33. Vossenaar, E.R., Zendman, A.J., Van Venrooij, W.J. 2004. Citrullination, a possible functional link between susceptibility genes and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 6:1-5.
 34. Schellekens, G.A., Visser, H., de Jong, B.A.W. 2000. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 43:155-163.
 35. Masson-Bessière, C., Sebbag, M., Durieux, J.J.,

- et al. 2000. In the rheumatoid pannus, anti-filaggrin autoantibodies are produced by local plasma cells and constitute a higher proportion of IgG than in synovial fluid and serum. *Clin. Exp. Immunol.* 119:544-552.
36. Masson-Bessière, C., Sebbag, M., Girbal-Neuhauser, E., et al. 1999. Synovial target antigens of antifilaggrin autoantibodies are deiminated forms of fibrin alpha and beta chains (abstract). *Rev. Rheum.* 66:754.
37. Serre, G. 2001. From perinuclear factor to citrulline, a target structure for autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 3(suppl. A): L012.
38. Girbal-Neuhauser, E., Durieux, J.J., Arnaud, M., et al. 1999. The epitopes targeted by rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated in various sites of (pro) filaggrin by deimination of arginine residues. *J. Immunol.* 162:585-594.
39. Simon, M., Girbal, E., Sebbag, M., et al. 1993. The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "anti-keratin antibodies", autoantibodies specific for rheumatoid arthritis. *J. Clinical Invest.* 101:273-281.
40. Visser, H., Le Cessie, S., Vos, K., et al. 2003. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. *Ann. Rheum. Dis.* 62:120-126.
41. Reparón-Schuijt, C.C., van Esch, W.J., van Kooten, C., et al. 2001. Secretion of anti-citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 44:41-47.
42. Sebbag, M., Chapuy-Regaud, S., Auger, I., et al. 2004. Clinical and pathophysiological significance of the autoimmune response to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 71:493-502.
43. Nogueira, V.C, Clavel, C., Sebbag, M., Serre, G. 2005. Autoantibodies to citrullinated proteins: ACPA. *Autoimmunity* 38:17-24.
44. Bas, S. 2005. Usefulness of anti-citrullinated protein antibodies in the diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. *Rev. Med. Suisse* 1:674-678.
45. Soós, L. Szekanecz, Z. Fekete, A., et al. 2007. Clinical evaluation of anti-mutated citrullinated vimentine by ELISA in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 34:1658-1663.