

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Análisis transcripcional de genes de respuesta a
Interferon de tipo 1 en pacientes con Artritis
Reumatoide temprana y familiares consanguíneos.**

Tesis que presenta

David de Santiago Algarra

Para obtener el grado de

Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular

Director (Codirectores) de la Tesis:

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz


Dr. José Antonio Enciso Moreno

San Luis Potosí, S.L.P., 5 de Diciembre del 2014




Constancia de aprobación de la tesis

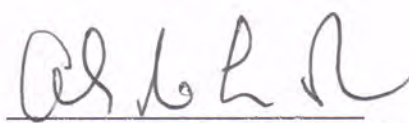
La tesis ***“Análisis transcripcional de genes de respuesta a Interferon de tipo 1 en pacientes con Artritis Reumatoide temprana y familiares consanguíneos”*** presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **David de Santiago Algarra** y aprobada el **cinco de diciembre del dos mil catorce** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



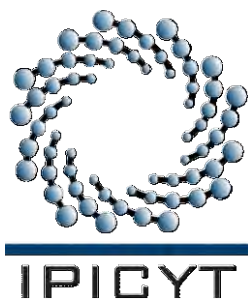
Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Codirector de la tesis



Dr. José Antonio Enciso Moreno
Codirector de la tesis



Dr. Alejandro De Las Peñas Nava
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de la Unidad de investigación Médica de Zacatecas del Instituto Mexicano del Seguro Social con el apoyo financiero del proyecto FIS/IMSS/PROT/PRI0/13/028 bajo la codirección de los Drs. José Antonio Enciso Moreno y Lina Raquel Riego Ruiz

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 279130 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 124 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 5 días del mes de diciembre del año 2014, se reunió a las 10:10 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

| | | |
|--|-------------------|------------------|
| Dr. José Antonio Enciso Moreno | Presidente | UIMZ-IMSS |
| Dr. Alejandro De Las Peñas Nava | Secretario | IPICYT |
| Dra. Lina Raquel Riego Ruiz | Sinodal | IPICYT |

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

David de Santiago Algarra

sobre la Tesis intitulada:

Análisis transcripcional de genes de respuesta a Interferon de tipo 1 en pacientes con Artritis Reumatoide temprana y familiares consanguíneos

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Dr. Antonio Enciso Moreno (UIMZ-IMSS)

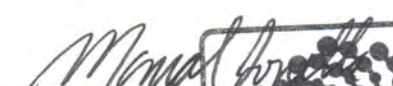
El Jurado, después de deliberar, determinó

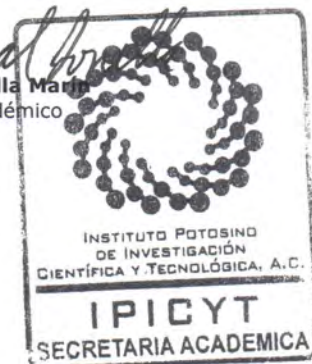
APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 11:35 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 5 días del mes de diciembre de 2014.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Agradecimientos

A mi familia y amigos, ya que sin ellos no estaría aquí

Agradezco el apoyo financiero del IMSS (073-2013)

Agradezco a las técnicas Yolanda García y Leonor Enciso por su apoyo en la logística de toma de muestra y procesamiento de la misma.

Contenido

| | |
|--------------------------------------|------|
| Constancia de aprobación de la tesis | ii |
| Créditos institucionales | iii |
| Acta de examen | iv |
| Agradecimientos | v |
| Lista de tablas | vii |
| Lista de figuras | viii |
| Abreviaturas | ix |
| Resumen | x |
| Abstract | xi |
| | |
| Introducción | 1 |
| Material y métodos | 4 |
| Resultados | 8 |
| Discusión | 11 |
| Referencias | 17 |

Lista de tablas

| | |
|--|---|
| Tabla 1. Secuencias de oligos utilizados para qPCR de los genes de respuesta a IFN. | 7 |
| Tabla 2. Características de los grupos de estudio pareados por edad, sexo y U/mL de ACCP | 8 |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Fig 1. Análisis de expresión relativa de los genes LY6E y RSAD2 en pacientes con ART y familiares consanguíneos ACCP+ y ACCP- | 22 |
| Fig 2. Análisis de expresión relativa de los genes MXA y MXB en pacientes con ART y familiares consanguíneos ACCP+ y ACCP- | 23 |
| Fig 3. Análisis de expresión relativa de los genes HERC5 e ISG15 en pacientes con ART y familiares consanguíneos ACCP+ y ACCP- | 24 |
| Fig 4. Regulación de los genes inducidos por IFN tipo I en las diferentes etapas del desarrollo de la enfermedad. | 25 |

Abreviaturas (opcional)

(título centrado; dos columnas sin líneas visibles; la tabla indica las abreviaturas (en negritas) utilizadas dentro del manuscrito en la columna izquierda (justificación izquierda) y el significado de la abreviatura en la columna derecha (justificación izquierda))

| | |
|--------------|--|
| AR | Artritis reumatoide |
| ACCP | Anticuerpos contra peptidos citrulinados |
| ARt | Artritis temprana |
| ARc | Artritis crónica |
| INF | Interferón |
| FCCP+ | Familiares de primer grado con valores de ACCP positivos |
| FCCP- | Familiares de primer grado con valores de ACCP negativos |

Resumen

Análisis transcripcional de genes de respuesta a Interferon de tipo 1 en pacientes con Artritis Reumatoide temprana y familiares consanguíneos

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida caracterizada por la presencia de autoanticuerpos de tipo IgM e IgG. Se ha observado que en sujetos sanos los autoanticuerpos, en particular contra péptidos citrulinados (ACCP), aumentan el riesgo a desarrollar AR. El riesgo es aún mayor en familiares de primer grado de pacientes con AR. Por otra parte, los genes inducidos por Interferon de tipo I predicen el éxito o fracaso de la terapia biológica, pero no se sabe si puedan predecir el desarrollo de la AR o si se relacionan con la seropositividad a ACCP. Algunos autores sugieren que la sobreexpresión de 7 genes (MXA, MXB, LY6E, ISG15, EPSTI1, RSAD2 y HERC5) se asocia con la progresión a la fase clínica temprana de AR. En este estudio evaluamos la expresión relativa de estos 7 genes en sangre periférica de sujetos en diferente estado de evolución de esta enfermedad mediante qPCR. En particular comparamos sujetos en estado preclínico y aquellos en la etapa temprana del desarrollo de AR. Se tomó sangre a 16 pacientes con AR, a 20 familiares de primer grado de pacientes con AR y a 10 sujetos sanos. Se separó el suero para medir la presencia de anticuerpos ACCP y se aisló RNA de sangre para producir cDNA. Con el cDNA de cada sujeto se cuantificaron los niveles de expresión relativa de los genes MXA, MXB, LY6E, ISG15, EPSTI1, RSAD2 y HERC5 por el método de $\Delta\Delta Ct$. La expresión de LY6E, ISG15 y RSAD2 están elevados únicamente en los familiares de pacientes con AR con respecto a los sanos ($p < 0.05$); la expresión de HERC5 se encuentra aumentada en pacientes con AR temprana con respecto a los sanos y respecto a los pacientes con AR crónica ($p < 0.05$) y MXB solo se eleva en pacientes con ARt y familiares ACCP+ en comparación a los familiares ACCP- y sujetos sanos, respectivamente ($p < 0.05$). Los niveles de expresión de MXB y HERC5 se relacionan con la seropositividad a ACCP y pueden predecir el desarrollo de las diferentes etapas de evolución de la AR. Por su parte LY6E, ISG15 y RSAD2 pueden predecir la evolución a una fase pre-clínica en sujetos ACCP+, pero no a la fase de enfermedad de AR temprana.

PALABRAS CLAVE.

ACCP, Firma de IFN tipo I, Riesgo hereditario

Abstract

Transcriptional analysis of Interferon type I gene response in early rheumatoid arthritis and first degree relatives

Rheumatoid Arthritis (RA) is an autoimmune disease of unknown etiology, distinguished by the presence of IgM and IgG autoantibodies in serum. It has been reported that the presence of autoantibodies, specially against citrullinated peptides (ACCP), in healthy subjects increase the risk to developing RA. This risk is even greater in first-degree relatives of patients with RA. The Interferon type I response genes, have been related to predict the therapeutic outcome in RA with biologic treatment, however, is not clear if can predict the development of RA or their association with in ACCP seropositivity. We suggest that overexpression of seven IFN type I response genes (MXA, MXB, LY6E, ISG15, EPSTI1, RSAD2 y HERC5) are involved in the early clinic phase progression. In this study, we evaluated the relative expression of those seven genes in peripheral blood of subjects of different disease stage. In particular, compared between the preclinic stage and the early stage of RA. Whole blood samples were collected and total RNA extracted from 16 RA patients, 20 first degree relatives and 10 healthy subjects. We determined the serum levels of ACCP antibodies. The relative expression of MXA, MXB, LY6E, ISG15, EPSTI1, RSAD 2 and HERC5 was calculated by the $\Delta\Delta C_t$ method. LY6E, ISG15 and RSAD2 is up-regulated only in the first-degree relatives of RA patients compared to healthy subjects ($p < 0.05$); HERC5 is up-regulated in early RA compared to healthy subjects and patients with chronic RA ($p < 0.05$); and MXB is up-regulated in patients with early RA and ACCP+ relatives compared to ACCP- relatives and healthy subjects. The expression of MXB and HERC5 seems to be related with the seropositivity to ACCP presence and might predict the development in different stages of RA. On the other hand, LY6E, ISG15 and RSAD2 are useful to predict the transition to a pre-clinical stage with ACCP+, but not to the early RA stage.

KEY WORDS.

ACCP, IFN type I signature, Hereditary risk.

INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, sistémica, crónica, progresiva, bilateral con daño irreversible a estructuras articulares. La AR es una de las enfermedades reumáticas más comunes, con una incidencia mundial de 0.5% a 2%. La etiología de la AR no está definida, sin embargo se consideran factores de riesgo el tabaquismo, la dieta, la edad, el sexo, exposición a diversos agentes infecciosos y la susceptibilidad genética [1,2].

Los criterios de clasificación de la AR propuestos en 1987 por el Colegio Americano de Reumatología (ACR, por sus siglas en inglés) fueron útiles para diferenciar la AR crónica con un periodo largo de progresión de las otras enfermedades reumáticas tales como lupus eritematoso sistémico, osteoartritis, artritis psoriasica, etc. Sin embargo, el diagnóstico definitivo de la AR en etapas iniciales, es decir menos de seis meses de evolución, no se puede realizar confiablemente ya que los criterios se basan en un daño que no es claramente observable en esta etapa del desarrollo de la enfermedad. Es por esto que el ACR y la Liga Europea Contra el Reumatismo (EULAR, por sus siglas en inglés) establecieron en el 2010 nuevos criterios para clasificar la AR en sus etapas iniciales. Entre los cambios realizados se incluye la cuantificación de los niveles de anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados (ACCP) que se usan como marcador serológico pronóstico de desarrollo de AR con un especificidad del 95% [3]. Aproximadamente el 70% de los pacientes con AR presentan autoanticuerpos, ya sea factor reumatoide (FR) IgM o ACCP [4].

Para explicar el desarrollo de la AR se ha propuesto un modelo de tres fases: 1) una fase inicial donde es preponderante un riesgo genético, 2) una fase pre-clínica autoinmune, y 3) una fase clínica con síntomas claros de la enfermedad. Este modelo sugiere que las interacciones entre los factores ambientales (cigarro, infecciones bacterianas y virales) y los riesgos genéticos pueden llevar a una fase autoinmune pre-clínica caracterizada por la presencia de autoanticuerpos como el factor reumatoide (FR) y ACCP sin la inflamación característica de la AR. Posteriormente, futuras interacciones con factores ambientales pueden llevar de la fase pre-clínica a la fase clínica de la AR, caracterizada por la inflamación articular

[5]. Estudios de cohorte prospectiva de seguimiento a cinco años a familiares de primer grado (hijos/as y hermanos/as) de pacientes con AR, han determinado que aproximadamente el 50% de los familiares de primer grado con valores positivos de ACCP pueden desarrollar artritis en un lapso de cinco años (Ramos-Remus, C. Manuscrito en preparación). Sin embargo, el paso de la fase pre-clínica a la clínica no se ha descrito ampliamente, mucho menos a nivel molecular. Se sabe que la presencia de FR y ACCP tiene relación con la evolución de la enfermedad [6]. Así, una vez que el paciente ha desarrollado AR, la hipercelularidad y la continua inflamación del tejido sinovial puede llegar a la invasión y destrucción del cartilago adyacente mediante la activación de condrocitos y osteoclastos [7,8]. Durante todo este proceso, las citocinas proinflamatorias tienen un papel fundamental, que promueven la autoinmunidad, incluso antes de la generación del infiltrado sinovial, para posteriormente participar en el desarrollo y mantenimiento de la inflamación sinovial (sinovitis crónica) y finalmente para mediar la destrucción del tejido sinovial.

Se ha sugerido que en la etiología de la AR, los interferones (IFN) de tipo I están involucrados desde las fases tempranas y ayudan a perpetuar la respuesta autoinmune. Los IFNs de tipo I son los más numerosos de los IFNs, con cinco tipos: IFN- α , - β , - ϵ , - κ y - ω ; los más abundantes y mejor estudiados son el IFN- α y - β [9]. Se sabe que los IFNs de tipo I tienen actividad antiviral e inmunomoduladora [10]. Estos IFNs inducen la maduración de células dendríticas, y aumentan la expresión de quimiocinas, moléculas co-estimuladoras y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II [11]. Los IFNs de tipo I se producen principalmente por células dendríticas plasmacitoides (CDp) en respuesta a DNA o RNA viral e incluso por complejos inmunes antígeno-anticuerpo [12]. En particular, el IFN- α promueve la diferenciación de células dendríticas, la polarización de células th0 a th1, y la activación de la respuesta citotóxica mediada por linfocitos CD8+ y NKT, e induce además la diferenciación de linfocitos B, la producción de anticuerpos y el cambio de isotipo a IgG [10]. En enfermedades autoinmunes, los complejos inmunes que contienen DNA o RNA se forman a partir de material apoptótico unidos a auto-anticuerpos que actúan como

inductores endógenos de IFN- α [13]. El mecanismo de cómo estos complejos inmunes interferogénicos activan CDp para iniciar la respuesta autoinmune se propuso inicialmente en lupus eritematoso sistémico (LES) [14]. En LES los complejos inmunes se internalizan por endosomas en CDp a través del receptor IIA de la fracción Fc- γ de inmunoglobulinas (Fc- γ RIIA), en donde interactúan con TLR7 y TLR9. Tras la activación de los TLR7/9, se promueve la cascada de MyD88 que induce la fosforilación y traslocación al núcleo del factor regulador de IFN 7(IRF-7). Esto da inicio a la transcripción de los genes de IFN tipo I.

Todos los IFNs de tipo I se unen al receptor de IFN de tipo I (IFNAR) que consiste en dos cadenas polipeptídicas: IFNAR1 e IFNAR2. Esta unión induce la transcripción de una gran cantidad de genes, muchos con función desconocida, pero algunos involucrados en la respuesta inmune contra virus, que inhiben la transcripción viral y promoven la degradación del material genético viral [15]. Paradójicamente, la expresión elevada de estos genes estimulados por IFN se han asociado al desarrollo de LES [16] y recientemente se han descrito también un grupo de genes regulados por IFN de tipo I en AR [17] y en el síndrome de Sjögren [18]. Dado que estos genes conforman un transcriptoma específico asociado a pacientes con AR, se les ha denominado como huella transcripcional de IFN de tipo I o firma del IFN- α . El uso de esta firma del IFN- α se basa en los promedios de la expresión obtenida de un análisis de expresión por microarreglos sin determinar las dispersiones de dichos valores y sin confirmar por qPCR su expresión. Además, se describió en solo se expresa en el 50 % de los sujetos con AR [19].

La firma de IFN- α se compone de más de 15 genes de los cuales destacan por su actividad antiviral MXA, MXB, ISG15, EPSTI1, RSAD2, HERC5 y LY6E. Sin embargo, su función en AR o en LES no se ha descrito. Se ha observado una disminución del índice de actividad de la enfermedad (DAS28, por sus siglas en inglés) se asoció a una baja de la expresión de genes de la firma de IFN en pacientes anglosajones con AR sometidos a terapia con Rituximab (anti-CD20) [20]. Si bien la expresión de los genes puede relacionarse con una eficacia del tratamiento en población anglosajona, hasta la fecha no hay estudios que indiquen

si la expresión de estos mismos genes puede asociarse a diferentes estadios de la enfermedad o predecir el desarrollo temprano de AR en poblaciones mestizas. Así, en este trabajo nos propusimos comparar la expresión de los genes MXA, MXB, ISG15, EPSTI1, RSAD2, HERC5 y LY6E en familiares de primer grado seropositivos y seronegativos a ACCP y pacientes con AR de recién diagnóstico, con pacientes con AR crónica activa y sujetos aparentemente sanos sin AR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

De acuerdo a los criterios de clasificación de la ACR/EULAR del 2010, en la Unidad de Artritis y Reumatismo en Guadalajara, Jalisco, México, se conformó una cohorte de pacientes con AR y de sus familiares de primer grado, hijos(as) y hermanos(as), durante el periodo de diciembre del 2013 a mayo del 2014. De esta cohorte se seleccionaron 10 pacientes con AR que presentaron daño e inflamación articular, con una evolución de la enfermedad mayor a 2 años y bajo tratamiento con metotrexate, el cual forma parte de los fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad (FARME). Además, se seleccionaron bajo los mismo criterios a 10 familiares de primer grado con títulos negativos de anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados (ACCP) y a 10 familiares con títulos positivos de ACCP mayores a 25 U/ml, todos aparentemente sanos con evaluación clínica negativa a AR (sin dolor o inflamación articular). Se incluyeron además seis pacientes recién diagnosticados con AR, con un periodo menor a un año de evolución y que fueron remitidos del departamento de reumatología del Hospital General de Zona 1 (HGZ1) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de Zacatecas. Estos pacientes con AR de diagnóstico temprano (ARt) presentaban títulos positivos de ACCP mayores a 25 U/ml. Finalmente, en la Unidad de Investigación Médica de Zacatecas (UIMZ) del IMSS, se seleccionaron como controles negativos a 10 sujetos sanos con títulos negativos de ACCP y sin antecedentes familiares de AR o de alguna enfermedad de tejido musculoesquelético. Todos los sujetos del estudio fueron negativos a infección por hepatitis B y C, diabetes tipo I, cáncer, enfermedades del tejido

musculoesquelético o que estuvieran bajo tratamiento con medicamentos inmunosupresores. Todos los sujetos del estudio firmaron una carta de consentimiento informado. El proyecto fue aprobado por el comité científico y de ética del IMSS con registro R2013-785-009 y se realizó bajo las normas internacionales para la investigación con muestras de seres humanos.

Toma y procesamiento de muestras

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de cada sujeto participante en tubos Vacutainer con EDTA (BD, EE.UU., #Cat. 367653) y suero a partir de tubos Vacutainer sin anticoagulante (BD, EE.UU., #Cat. 367815). A las muestras de sangre (4 mL/tubo) se les agregó 1 mL de RNA later (Ambion, EE.UU., #Cat.15596018) y se almacenaron a -70°C. El suero se obtuvo centrifugando a 3,500 RPM durante 7 minutos y se almacenó a -20°C.

Evaluación de niveles séricos de anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados

Los niveles de ACCP séricos en las muestras se realizó por ELISA con el estuche de detección de Inmmunoscan CCPlus (Eurodiagnóstica, Suecia, #Cat. RA-96PLUS), a una dilución 1:500 de suero con base en el manual del proveedor. El punto de corte considerado como positivo es de 25 U/mL

Extracción de RNA

La extracción de RNA de sangre total se realizó con un protocolo estandarizado en nuestro laboratorio con TRIzol (Ambion, US, #Cat. 15596018) y columnas de QIAamp (QIAGEN, US, #Cat. 52305). Brevemente, las muestras de sangre total se descongelaron a temperatura ambiente y se mezclaron con 5 ml de TRIzol agitando vigorosamente de forma manual. Se dejaron las muestras a temperatura ambiente tres minutos y se les adicionó 1 ml de cloroformo, se agitaron y se centrifugaron por 15 minutos a 12,000 RPM a 4°C. Se separó la fase acuosa y se añadió un volumen igual de etanol al 70%. Esta mezcla se depositó en la columna de QIAamp y se filtró utilizando un sistema QIAvac24 (QIAGEN, EE.UU., #Cat.19413) a una presión constante de 20 mm de Hg. Para degradar el DNA genómico se realizó un tratamiento en columna con el kit RNase free DNase (QIAGEN, EU, #Cat. 79254) con base a las instrucciones del proveedor. Finalmente la columna se lavó con el buffer de lavado RW1 de acuerdo al manual

de QIAGEN y el RNA se eluyó en 70 μ l de agua libre de Rnasas y el RNA se cuantificó en un espectrofotometro ND-1000 (Nanodrop, US).

Integridad del RNA

Para determinar la integridad del RNA se utilizaron 50 ng de material genético, los cuales se aplicaron a un casete de RNA 6000 nano (Agilent, US, #Cat.5067-1511) y se analizaron en un Bioanalyzer 2100 (Agilent, US, #Cat. G2940CA). Para la síntesis de cDNA y los ensayos posteriores de qPCR sólo se consideraron muestras de RNA que tuvieran un valor de RIN (número de integridad del RNA, por sus siglas en inglés) mínimo de seis.

Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se mezclaron 2.5 μ g de RNA, 200 U de la retrotranscriptasa SuperScript II (Invitrogen, EU, #Cat. 18064-014), 0.5 μ g de oligo dT12-18 (Invitrogen, EU, #Cat. 18418-012) y 40U de RNaseOUT (Invitrogen, EU, #Cat. 10777-019). Una vez obtenido el cDNA, se adicionaron 2U de RNaseH (Invitrogen,EU, #Cat. 18021-071) para un volumen final de reacción de 21 μ L. La síntesis se realizó de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

Ensayos de qPCR

Los oligos sentido y antisentido de los genes inducidos por IFN y para el gen constitutivo HPRT, se diseñaron en la plataforma ProbeFinder de Roche (<http://lifescience.roche.com>) y se sintetizaron por T4Oligo (Novik S.A., México). Las secuencias de los oligos utilizados en este estudio se describen en la Tabla 1. Para la reacción con qPCR se utilizó la enzima LightCycler 480 Probes Master (Roche, EE.UU., #Cat. 04707494001). Para cada reacción se utilizaron 50 ng de cDNA y se ensayaron por duplicado. Para la amplificación se usó el equipo LyghtCycler 480 (Roche, EE.UU.). Las temperaturas de los ciclos de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 10 minutos, y 45 ciclos de 95°C por 10 segundos de desnaturalización, 60°C por 30 segundos de alineación y 72°C de elongación por un segundo, con una fase de enfriamiento final a 4°C durante 30 segundos. Para normalizar los datos de expresión de los genes de respuesta a IFN se consideraron los valores de Ct de HPRT.

Tabla 1 Secuencias de oligos utilizados para qPCR de los genes de respuesta a IFN

| Gen | Oligo L (5'-3') | Oligo R (5'-3') |
|--------|---------------------------|-----------------------------|
| EPST11 | ccggagaaatgagatacaaagaat | ggtgaaccggttagctctg |
| RSAD2 | atgtgaaagcccaaggacac | tttggttcaaataaacactgattga |
| ISG15 | gaggcagcgaactcatcttt | agcatcttcaccgtcaggtc |
| MXA | atccagccaccattccaa | caacaagttaaattggtatcacagagc |
| MXB | ttcttcaaacacatccatatttca | cagtggtaagtctttctgccagt |
| LY6E | atcttctgccagtgctgct | gcttcaggcagtacagattgc |
| HERC5 | cttccagtgaaagtatcatcaagtg | ccagagcaaaatgctttgatt |
| HPRT | tgacctgatttatttgcatacc | cgagcaagacgttcagtcct |

Análisis estadístico

Para el análisis de expresión relativa los valores de Ct se utilizó el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se usó la media del ΔCt del grupo de sanos sin antecedentes para normalizar el $\Delta\Delta Ct$ de todos los sujetos del estudio. No se consideraron para el análisis los valores alejados del tercer cuartil (Q3) más 1.5 veces el rango intercuartílico (IQR) a un intervalo del 95% de confianza (*outliers*). Los datos de expresión relativa se graficaron con el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad, EE.UU.). Para comparar la expresión entre los grupos de estudio se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos, así como el post-test de Dunn para comparaciones entre todos los grupos.

RESULTADOS

Grupos de estudio

Para determinar si las diferencias en los niveles de expresión de los genes MXA, MXB, LY6E, ISG15, EPSTI1, RSAD2 y HERC5 se deben únicamente a diferencias en los niveles de anticuerpos contra péptidos cíclicos citrulinados (ACCP), se compararon las variables de edad, género y títulos de ACCP. Al comparar los cinco grupos de estudio pareados por edad, género y títulos de ACCP, solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los títulos de ACCP. Los pacientes con artritis reumatoide (AR) temprana (Art) y los pacientes con AR crónica (Arc) mostraron títulos más elevados de ACCP (287 U y 654 U, respectivamente) en comparación con los sanos, familiares de primer grado ACCP - (FCCP-) y FCCP+ (13.8 U, 13.3 U y 35.8 U, respectivamente) (tabla 2). Este aumento de hasta 8 veces entre los pacientes con AR y los FCCP indican que la elevación en los niveles de autoanticuerpos está asociado a la progresión de la fase de riesgo y pre-clínico al estado clínico de la enfermedad caracterizado por el proceso inflamatorio de la AR. No existen diferencias en los niveles de ACCP de los FCCP- y FCCP+, ni en los rasgos clínicos, pero se sabe que los FCCP+ están desarrollando una etapa subclínica de autoinmunidad.

Tabla 2 Características de los grupos de estudio pareados por edad, género y U/mL de ACCP

| Grupo | Sanos | FCCP- | FCCP+ | ARt | ARc | Valor P |
|--------------|-----------|-----------|-----------|--------------|--------------|---------|
| Edad | 37.4±18.8 | 49.0±15.3 | 35.5±8.91 | 41.8±9.0 | 49.4±9.7 | ns |
| Género (F/M) | 8/2 | 9/1 | 6/4 | 5/1 | 9/1 | ns |
| ACCP | 13.89±2.9 | 13.36±1.8 | 35.88±5.8 | 287.7±268.4* | 654.8±521.3* | <0.05 |

Análisis de expresión de los genes de respuesta a Interferon por qPCR

Para comprobar si un aumento en la expresión de los genes de respuesta a Interferon (IFN) está asociado con el paso de un fase pre-clínica a un estado de

AR temprana, comparamos los niveles de expresión en familiares de primer grado seropositivos y seronegativos a ACCP y pacientes con AR de recién diagnóstico, con pacientes con AR crónica activa y sujetos aparentemente sanos sin AR.

El análisis de expresión relativa de los 7 genes de respuesta a IFN mostró que solamente los niveles de expresión de LY6E (Fig. 1A), RSAD2 (Fig. 1B) e ISG15 (Fig. 3B) se elevan en familiares de primer grado FCCP+ y FCCP- en comparación con los sujetos sanos; sin embargo esta diferencia no se observaron diferencias de expresión entre los pacientes con ARt y ARc (Fig.1). Por otro lado, se observó un aumento en los niveles de expresión de MXA se observó en pacientes con ARt con respecto al grupo de sujetos sanos (Fig. 2A). En el caso de MXB ocurrió un aumento de su expresión en los pacientes con ARt en comparación con los FCCP-, así como en los FCCP+ con respecto a los sujetos sanos (Fig. 2B). Al evaluar la expresión de HERC5, se observó un aumento estadísticamente significativo en pacientes con ARt en comparación con los sujetos sanos, familiares ACCP+ y pacientes con ARc (Fig. 3A). Para EPSTI1 no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos (datos no mostrados)

Fig. 1 Análisis de expresión relativa de los genes LY6E y RSAD2 en pacientes con ARt y familiares consanguineos ACCP+ y ACCP. Se muestran los niveles de expresión de LY6E (**A**), RSAD2 (**B**) en el grupo de familiares seronegativos (FCCP-), seropositivos (FCCP+), pacientes con AR temprana (ARt), pacientes con AR crónica (ARc) y sujetos sanos. Barras horizontales muestran mediana y cuartiles. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

Fig. 2 Análisis de expresión relativa de los genes MXA y MXB en pacientes con ARt y familiares consanguineos ACCP+ y ACCP. Se muestran los niveles de expresión del gen MXA (**A**), y MXB (**B**) en el grupo de familiares seronegativos (FCCP-), seropositivos (FCCP+), pacientes con AR temprana (ARt), pacientes con AR crónica (ARc) y sujetos sanos. Barras horizontales muestran mediana y cuartiles. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

Fig. 3 Análisis de expresión relativa del gen HERC5 e ISG15 por PCR en pacientes con ART y familiares consanguíneos ACCP+ y ACCP. Se muestran los niveles de expresión del gen HERC5 (**A**) e ISG15 (**B**) en el grupo de familiares seronegativos (FCCP-), seropositivos (FCCP+), pacientes con AR temprana (ART), pacientes con AR crónica (ARc) y sujetos sanos. Barras horizontales muestran mediana y cuartiles. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

DISCUSIÓN

Actualmente, la búsqueda de biomarcadores asociados a progresión de AR es un área de estudio muy importante para asignar un tratamiento oportuno que evite el desarrollo de las fases crónicas de la enfermedad. Se ha sugerido que los genes regulados por IFN tipo I se encuentran elevados en sangre de pacientes con AR con respecto a sujetos [21]. Sin embargo, esto se ha probado en una cohorte de sujetos anglosajones que ya presentaban y manifestaciones clínicas de artritis y presencia de autoanticuerpos sin considerar a familiares directos de pacientes con AR que tienen riesgo a desarrollar AR pero que aún no presentan ninguna característica.

En el presente estudio se evaluaron las diferencias de expresión de genes de respuesta a IFN tipo I en familiares de primer grado (hijos/as y hermanos/as) de pacientes con AR, seronegativos y seropositivos a autoanticuerpos ACCP pero sin manifestaciones clínicas de AR; también se consideraron muestras de pacientes con AR temprana, esto es, pacientes cuyas manifestaciones clínicas no tenían más de un año de evolución, de recién diagnóstico y vírgenes a tratamiento. Finalmente se consideraron pacientes con AR crónica de más de dos años de evolución, que presentaban inflamación articular y bajo un esquema de tratamiento con fármacos modificadores de la enfermedad. Esto con el fin de comparar la expresión de los genes de respuesta a IFN tipo I en grupos con diferentes etapas de evolución de la AR y respecto a su seropositividad a ACCP.

A diferencia de los estudios previos realizados por el grupo de Verweij, C.L. y cols. [17] nuestros pacientes fueron seleccionados bajo los criterios de clasificación de la ACR/EULAR del 2010 [22] mientras que ellos utilizan la clasificación de la ACR de 1987, que identifica solo pacientes con sintomatología severa. Además incluimos por primera vez a pacientes con AR temprana y grupos de familiares consanguíneos que presentan un riesgo hereditario al desarrollo de la AR. La selección de todos los pacientes, familiares y controles fue supervisada clínicamente por dos reumatólogos certificados del Colegio Mexicano de Reumatología.

A la fecha no se conoce de manera clara cuales son los niveles de expresión de los genes de respuesta a IFN tipo I en sujetos sanos que poseen un riesgo hereditario por ser familiares de primer grado en ausencia y presencia de ACCP. Tampoco se sabe cómo ocurre la expresión de estos genes cuando se comparan grupos de pacientes con AR temprana o AR crónica. En ese contexto, este estudio contempla el análisis de los niveles de expresión relativa de genes regulados por IFN tipo I en grupos que representan estadios distintos de evolución de la AR. Considerando la importancia de los ACCP en el riesgo a desarrollar AR, los familiares consanguíneos fueron estratificados en ACCP- (con riesgo hereditario) y ACCP+ (alto riesgo). Para ello utilizamos una prueba serológica de ACCP de segunda generación avalada por la ACR y la EULAR como el método más confiable para evaluar los ACCP en la población [23]. Además de los dos grupos de familiares contamos con un grupo de pacientes con AR que tienen un periodo de evolución de menos de un año y que aún no reciben tratamiento. Estos tres grupos no están incluidos en estudios previos donde evalúan los niveles de genes regulados por IFN tipo I respecto al éxito terapéutico asociado a la administración del Rituximab [20], Tocilizumab [24] e Infliximab [25]. De igual forma, nosotros evaluamos los niveles de expresión de los genes de respuesta a INF tipo I por qPCR, la cual es más sensible que el análisis por microarreglos.

Aunque el IFN de tipo I es una citocina clave en la respuesta inmune innata y adquirida, y por ende en la fisiopatología de la AR, la expresión de los genes de respuesta a IFN depende de un balance de las citocinas presentes en el medio, especialmente el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). El concepto fundamental es que el TNF es esencial en el desarrollo de las fases crónicas, concepto basado en los resultados que la terapia biológica anti-TNF. Así, diversos ensayos clínicos y estudios genéticos han mostrado asociación entre los genes relacionados a TNF y pacientes ACCP positivos y genes relacionados con el IFN tipo I en pacientes con AR [26-29].

Palucka, A.K. y cols. [30] observaron que el TNF- α inhibe la maduración *in vitro* de células dendríticas plasmacitoides y mieloides, inhibiendo así la producción de IFNs de tipo I. No se sabe si este fenómeno esté presente *in vivo*. De ser así, un

aumento en los niveles de TNF- α disminuiría la producción de IFNs tipo I y de manera indirecta la expresión de los genes de respuesta a IFNs tipo I. Resultados de nuestro grupo (Macías-Segura, N. y cols. Manuscrito en preparación) observaron que existen niveles séricos elevados de TNF- α en los mismos grupos estudiados aquí, y que particularmente sus niveles incrementan en los pacientes con AR temprana y crónica. La expresión de los genes LY6E y RSAD2 (fig. 1) aumenta en los familiares de pacientes (FCCP+ y FCCP-) en comparación con los sanos, pero no en pacientes con AR (ARt y ARc). Estos datos apoyan el concepto de que el aumento del TNF- α sérico se asocia a una disminución de la expresión de los genes de respuesta a IFN tipo I analizados en este estudio.

Estudios recientes han propuesto el uso de la proteína sérica MxA como un biomarcador para evaluar la actividad de los IFN de tipo I y el índice de actividad de la enfermedad en otras enfermedades reumáticas como el síndrome de Sjögren [31]. Sin embargo, al evaluar los niveles de expresión del gen MXA (fig. 2A) observamos que si bien sus niveles de expresión se encuentran aumentados en pacientes con ARt en comparación con los sanos, esto no se cumple al comparar con los familiares. Además, los niveles de expresión de MXA disminuyen en los pacientes con ARc, lo que impide su uso como biomarcador para evaluar la actividad de la AR. No obstante, para comprobar este hallazgo, se tendrían que evaluar los niveles séricos de esta proteína.

Por otro lado se ha descrito que niveles altos de expresión de algunos genes de respuesta a IFN tipo I pueden predecir la respuesta clínica a medicamentos biológicos en AR, al disminuir la expresión de estos genes cuando la actividad de la enfermedad disminuye [24,25]. En este sentido, MXB, un gene que tiene que ver con actividad antiviral en infecciones por VIH [32,33] y que es regulado por IFN tipo I, puede ser otro candidato a biomarcador. Al analizar los niveles de expresión de MXB (fig. 2B) observamos que existe un aumento en pacientes con ARt y FCCP+ en comparación con el grupo FCCP- y sanos, respectivamente. Este aumento en los niveles de MXB parece estar ligado a la presencia de autoanticuerpos en suero (ARt y FCCP+) debido a que sus niveles de expresión aumentan conforme se avanza en las diferentes etapas de evolución de la

enfermedad, con una reducción en los niveles de expresión de MXB en los pacientes con AR crónica. Este hallazgo sugiere que la medición de los niveles de expresión de MXB pudiera servir para evaluar la evolución de la enfermedad en las etapas tempranas, y resultaría interesante analizar además como se asocia su expresión con los niveles de ACCP y cuál podría ser su papel en la evolución de un estado preclínico hasta AR temprana.

La proteína ISG15, es una proteína tipo ubiquitina que presenta también actividad antiviral. Esta actividad depende de la conjugación de ISG15 a su proteína blanco, en un proceso denominado ISGilación [34]. Esta conjugación está mediada por HERC5, la cual es una ligasa E3 que interviene en el paso final de la ISGilación [35] y es esencial para la conjugación de ISG15 y por ende para su actividad antiviral [36]. Se ha descrito que factores de transcripción como el Factor Regulador de Interferón 3 (IRF3, por sus siglas en inglés) pueden sufrir ISGilación, bloqueando la unión con su inhibidor y promoviendo la transcripción de genes de respuesta a IFN [37]. En nuestro estudio evaluamos los niveles de expresión de los genes ISG15 y HERC5. Nuestros resultados muestran que los niveles de expresión de HERC5 (fig. 3A) e ISG15 (fig. 3B) se encuentran aumentados en sujetos FCCP+ con respecto a los sanos. Estos datos sugieren que la expresión combinada de ambos genes puede inducir una transcripción elevada de genes de respuesta a IFN tipo I en sujetos FCCP+. Sin embargo, sería necesario medir la actividad de la enzima HERC5, los niveles protéicos de ISG15 e incluso las fracciones conjugadas de IRF3/ISG15 en los diferentes grupos del estudio para determinar si estas moléculas participan en la evolución de la enfermedad o en el establecimiento de la autoinmunidad.

Por otra parte, los niveles de expresión de HERC5 también se encuentran aumentados en pacientes con ART en comparación con los sanos y con respecto a los pacientes con ARc. Por lo tanto, los niveles de HERC5 pudieran servir para evaluar el desarrollo a una fase de autoinmunidad preclínica, pero no para evaluar su evolución a la enfermedad de ART. Finalmente, los niveles de expresión de HERC5 en pacientes con AR crónica se encuentran disminuidos en comparación

con los ARt. Así, estos datos sugieren que los niveles de expresión de HERC5 no son útiles para evaluar la actividad de la enfermedad.

Interesantemente, durante la fase pre-clínica se observa que el balance IFN tipo I/TNF- α está inclinado hacia una sobreexpresión de los genes de respuesta específica a IFN tipo I. Así, los niveles de expresión de los genes de respuesta a IFN tipo I en FCCP+ y FCCP- es mayor en comparación con los controles, mientras que los niveles de TNF- α de los pacientes con AR temprana y crónica es mayor en comparación con los demás grupos del estudio. Este aumento de los niveles de expresión de los genes regulados por IFN tipo I en los FCCP+ con alto riesgo a desarrollar AR, correlaciona con la producción de IFNs de tipo I. Los resultados de Romblom apoyan este concepto dado que la presencia de autoanticuerpos está mediada en parte por la presencia crónica de IFNs de tipo I [9]. En la figura 4 se muestra un modelo de la regulación de los genes de respuesta IFN tipo I en las diferentes etapas de desarrollo a la AR (FCCP-, FCCP+ y ARt). Este modelo considera que los genes de ISG15, RSAD2 y LY6E están inducidos en sujetos FCCP- y sugiere una regulación independiente a la síntesis de anticuerpos IgG contra péptidos citrulinados. Sin embargo, en la etapa pre-clínica en sujetos FCCP+ se forman complejos autoinmunes, que inducen la producción de IFNs de tipo I. Al unirse a su receptor, estos IFNs inducen la expresión de los genes ISG15, RSAD2, LY6E, HERC5 y MXB. Sin embargo, en la fase aguda de la artritis reumatoide ocurre un aumento de los niveles de citocinas proinflamatorias. Estas citocinas como TNF- α reprimen la expresión de los genes de respuesta a IFN tipo I ISG15, RSAD2 y LY6E, mientras que inducen la expresión de genes HERC5, MXA y MXB.

Fig. 4 Regulación de los genes inducidos por IFN tipo 1 en las diferentes etapas del desarrollo de la enfermedad. En el modelo de la historia natural de la artritis reumatoide existen tres etapas: riesgo genético, autoinmunidad pre-clínica y la artritis reumatoide. Se ha propuesto que factores ambientales promueven el paso de una etapa a otra. En la fase de riesgo hereditario, los genes ISG15, RSAD2 y LY6E se encuentran aumentados independientes de la presencia de anticuerpos contra péptidos citrulinados. En la fase pre-clínica, los complejos autoinmunes llevan a la producción de IFN de tipo I y el aumento en expresión de los genes ISG15, RSAD2, LY6E, HERC5 y MXB. Cuando la artritis reumatoide se acentúa ocurre un aumento de los niveles de TNF- α , lo que reprime la expresión de los genes ISG15, RSAD2 y LY6E, pero induce la expresión aumentada de los genes HERC5, MXB y MXA.

Abreviaturas: FCCP-, familiares de primer grado negativos a anticuerpos contra péptidos citrulinados; FCCP+, familiares de primer grado positivos a anticuerpos contra péptidos citrulinados; ACCP, anticuerpos contra péptidos citrulinados; IFN, interferón; TNF, factor de necrosis tumoral; IgM, inmunoglobulina de clase M. HLADR4, antígeno leucocitario humano DR4; CTLA4, antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico; PADI4, peptidil deiminasa de argininas tipo 4.

REFERENCIAS

1. Alamanos Y, Drosos AA (2005) Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 4 (3):130-136. doi:S1568-9972(04)00194-6 [pii] 10.1016/j.autrev.2004.09.002
2. Martínez-Elizondo P (2011) *Introducción a la Reumatología*. 5th. Edition edn.,
3. Pruijn GJ, Wiik A, van Venrooij WJ (2010) The use of citrullinated peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12 (1):203. doi:ar2903 [pii] 10.1186/ar2903
4. van Venrooij WJ, Hazes JM, Visser H (2002) Anticitrullinated protein/peptide antibody and its role in the diagnosis and prognosis of early rheumatoid arthritis. *Neth J Med* 60 (10):383-388
5. Kolfenbach JR, Deane KD, Derber LA, O'Donnell C, Weisman MH, Buckner JH, Gersuk VH, Wei S, Mikuls TR, O'Dell J, Gregersen PK, Keating RM, Norris JM, Holers VM (2009) A prospective approach to investigating the natural history of preclinical rheumatoid arthritis (RA) using first-degree relatives of probands with RA. *Arthritis Rheum* 61 (12):1735-1742. doi:10.1002/art.24833
6. Rantapaa-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* 48 (10):2741-2749. doi:10.1002/art.11223
7. Jimenez-Boj E, Redlich K, Turk B, Hanslik-Schnabel B, Wanivenhaus A, Chott A, Smolen JS, Schett G (2005) Interaction between synovial inflammatory tissue and bone marrow in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 175 (4):2579-2588. doi:175/4/2579 [pii]
8. Panayi GS (1993) The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 32 Suppl 1:4-14
9. Ronnblom L (2011) The type I interferon system in the etiopathogenesis of autoimmune diseases. *Ups J Med Sci* 116 (4):227-237. doi:10.3109/03009734.2011.624649

10. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH (2005) Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 23:307-336. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115843
11. Baccala R, Hoebe K, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN (2007) TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med* 13 (5):543-551. doi:nm1590 [pii] 10.1038/nm1590
12. Cao W, Liu YJ (2007) Innate immune functions of plasmacytoid dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 19 (1):24-30. doi:S0952-7915(06)00236-6 [pii] 10.1016/j.coi.2006.11.004
13. Lovgren T, Eloranta ML, Bave U, Alm GV, Ronnblom L (2004) Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG. *Arthritis Rheum* 50 (6):1861-1872. doi:10.1002/art.20254
14. Ronnblom L, Eloranta ML, Alm GV (2006) The type I interferon system in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 54 (2):408-420. doi:10.1002/art.21571
15. Samuel CE (2001) Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 14 (4):778-809, table of contents. doi:10.1128/CMR.14.4.778-809.2001
16. Obermoser G, Pascual V (2010) The interferon-alpha signature of systemic lupus erythematosus. *Lupus* 19 (9):1012-1019. doi:19/9/1012 [pii] 10.1177/0961203310371161
17. Lubbers J, Brink M, van de Stadt LA, Vosslamber S, Wesseling JG, van Schaardenburg D, Rantapaa-Dahlqvist S, Verweij CL (2013) The type I IFN signature as a biomarker of preclinical rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 72 (5):776-780. doi:annrheumdis-2012-202753 [pii] 10.1136/annrheumdis-2012-202753
18. Nguyen CQ, Peck AB (2013) The Interferon-Signature of Sjogren's Syndrome: How Unique Biomarkers Can Identify Underlying Inflammatory and Immunopathological Mechanisms of Specific Diseases. *Front Immunol* 4:142. doi:10.3389/fimmu.2013.00142

19. van der Pouw Kraan TC, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, Voskuyl AE, Rustenburg F, Baggen JM, Ibrahim SM, Fero M, Dijkmans BA, Tak PP, Verweij CL (2007) Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic profiling of peripheral blood cells: assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients. *Ann Rheum Dis* 66 (8):1008-1014. doi:ard.2006.063412 [pii] 10.1136/ard.2006.063412
20. Raterman HG, Vosslander S, de Ridder S, Nurmohamed MT, Lems WF, Boers M, van de Wiel M, Dijkmans BA, Verweij CL, Voskuyl AE (2012) The interferon type I signature towards prediction of non-response to rituximab in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 14 (2):R95. doi:ar3819 [pii] 10.1186/ar3819
21. van Baarsen LG, Bos WH, Rustenburg F, van der Pouw Kraan TC, Wolbink GJ, Dijkmans BA, van Schaardenburg D, Verweij CL (2010) Gene expression profiling in autoantibody-positive patients with arthralgia predicts development of arthritis. *Arthritis Rheum* 62 (3):694-704. doi:10.1002/art.27294
22. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Menard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawski-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G (2010) 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 62 (9):2569-2581. doi:10.1002/art.27584
23. Levesque MC, Zhou Z, Moreland LW (2009) Anti-cyclic citrullinated peptide testing for the diagnosis of rheumatoid arthritis and the quest for improved sensitivity and predictive value. *Arthritis Rheum* 60 (8):2211-2215. doi:10.1002/art.24720
24. Sanayama Y, Ikeda K, Saito Y, Kagami S, Yamagata M, Furuta S, Kashiwakuma D, Iwamoto I, Umibe T, Nawata Y, Matsumura R, Sugiyama T, Sueishi M, Hiraguri M, Nonaka K, Ohara O, Nakajima H (2014) Prediction of therapeutic responses to tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis:

biomarkers identified by analysis of gene expression in peripheral blood mononuclear cells using genome-wide DNA microarray. *Arthritis Rheumatol* 66 (6):1421-1431. doi:10.1002/art.38400

25. van Baarsen LG, Wijbrandts CA, Rustenburg F, Cantaert T, van der Pouw Kraan TC, Baeten DL, Dijkmans BA, Tak PP, Verweij CL (2010) Regulation of IFN response gene activity during infliximab treatment in rheumatoid arthritis is associated with clinical response to treatment. *Arthritis Res Ther* 12 (1):R11. doi:ar2912 [pii] 10.1186/ar2912

26. Niewold TB, Hua J, Lehman TJ, Harley JB, Crow MK (2007) High serum IFN-alpha activity is a heritable risk factor for systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 8 (6):492-502. doi:6364408 [pii] 10.1038/sj.gene.6364408

27. Baccala R, Kono DH, Theofilopoulos AN (2005) Interferons as pathogenic effectors in autoimmunity. *Immunol Rev* 204:9-26. doi:IMR252 [pii] 10.1111/j.0105-2896.2005.00252.x

28. Raychaudhuri S (2010) Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 22 (2):109-118. doi:10.1097/BOR

29. Sigurdsson S, Padyukov L, Kurreeman FA, Liljedahl U, Wiman AC, Alfredsson L, Toes R, Ronnelid J, Klareskog L, Huizinga TW, Alm G, Syvanen AC, Ronnblom L (2007) Association of a haplotype in the promoter region of the interferon regulatory factor 5 gene with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56 (7):2202-2210. doi:10.1002/art.22704

30. Palucka AK, Blanck JP, Bennett L, Pascual V, Banchereau J (2005) Cross-regulation of TNF and IFN-alpha in autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (9):3372-3377. doi:0408506102 [pii] 10.1073/pnas.0408506102

31. Maria NI, Brkic Z, Waris M, van Helden-Meeuwsen CG, Heezen K, van de Merwe JP, van Daele PL, Dalm VA, Drexhage HA, Versnel MA (2014) MxA as a clinically applicable biomarker for identifying systemic interferon type I in primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 73 (6):1052-1059. doi:annrheumdis-2012-202552 [pii] 10.1136/annrheumdis-2012-202552

32. Busnadiego I, Kane M, Rihn SJ, Preugschas HF, Hughes J, Blanco-Melo D, Strouville VP, Zang TM, Willett BJ, Boutell C, Bieniasz PD, Wilson SJ (2014) Host

and viral determinants of Mx2 antiretroviral activity. *J Virol* 88 (14):7738-7752. doi:JVI.00214-14 [pii] 10.1128/JVI.00214-14

33. Fricke T, White TE, Schulte B, de Souza Aranha Vieira DA, Dharan A, Campbell EM, Brandariz-Nunez A, Diaz-Griffero F (2014) MxB binds to the HIV-1 core and prevents the uncoating process of HIV-1. *Retrovirology* 11:68. doi:s12977-014-0068-x [pii] 10.1186/PREACCEPT-6453674081373986

34. Durfee LA, Lyon N, Seo K, Huibregtse JM (2010) The ISG15 conjugation system broadly targets newly synthesized proteins: implications for the antiviral function of ISG15. *Mol Cell* 38 (5):722-732. doi:S1097-2765(10)00337-0 [pii] 10.1016/j.molcel.2010.05.002

35. Wong JJ, Pung YF, Sze NS, Chin KC (2006) HERC5 is an IFN-induced HECT-type E3 protein ligase that mediates type I IFN-induced ISGylation of protein targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (28):10735-10740. doi:0600397103 [pii] 10.1073/pnas.0600397103

36. Dastur A, Beaudenon S, Kelley M, Krug RM, Huibregtse JM (2006) Herc5, an interferon-induced HECT E3 enzyme, is required for conjugation of ISG15 in human cells. *J Biol Chem* 281 (7):4334-4338. doi:M512830200 [pii] 10.1074/jbc.M512830200

37. Shi HX, Yang K, Liu X, Liu XY, Wei B, Shan YF, Zhu LH, Wang C Positive regulation of interferon regulatory factor 3 activation by Herc5 via ISG15 modification. *Mol Cell Biol* 30 (10):2424-2436. doi:MCB.01466-09 [pii] 10.1128/MCB.01466-09

FIGURAS

Figura 1

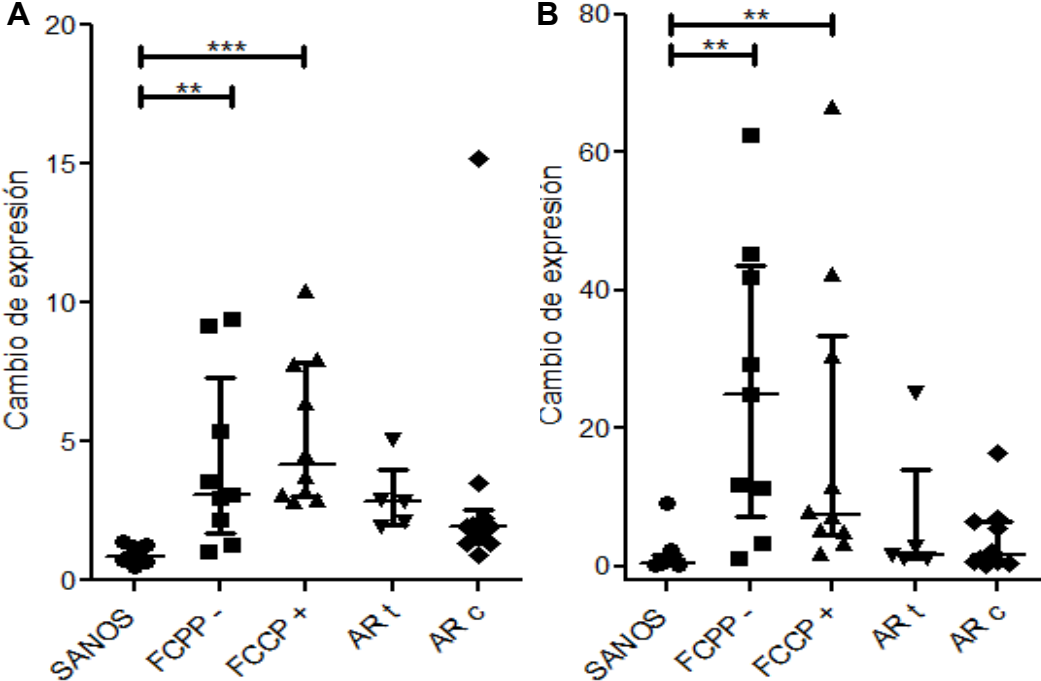


Figura 2

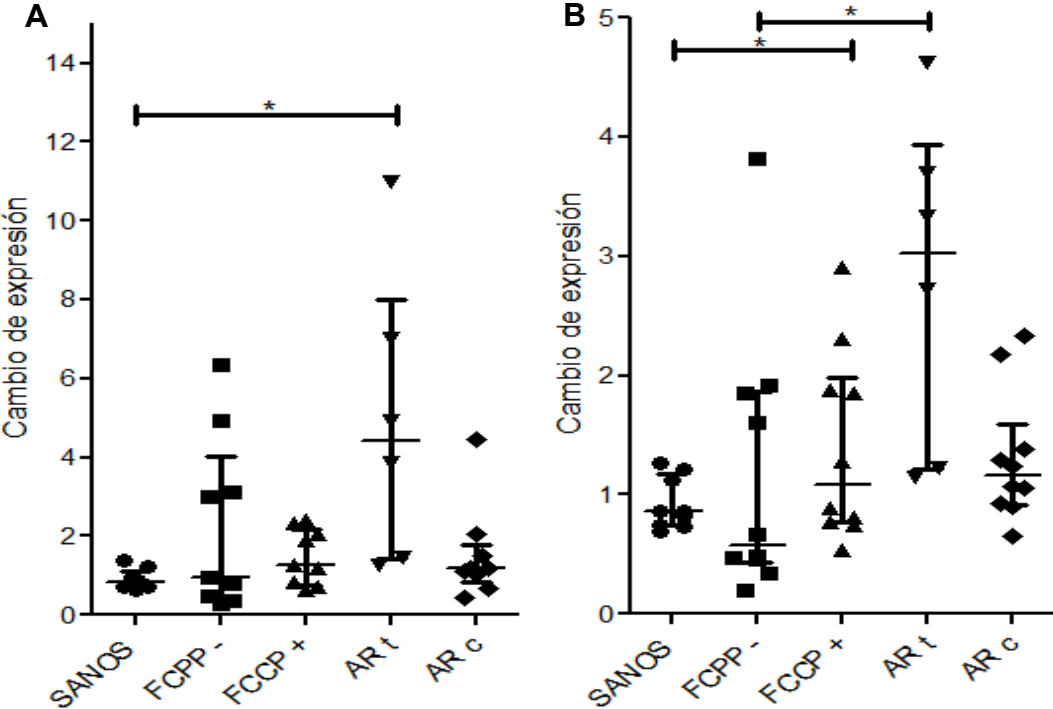


Figura 3

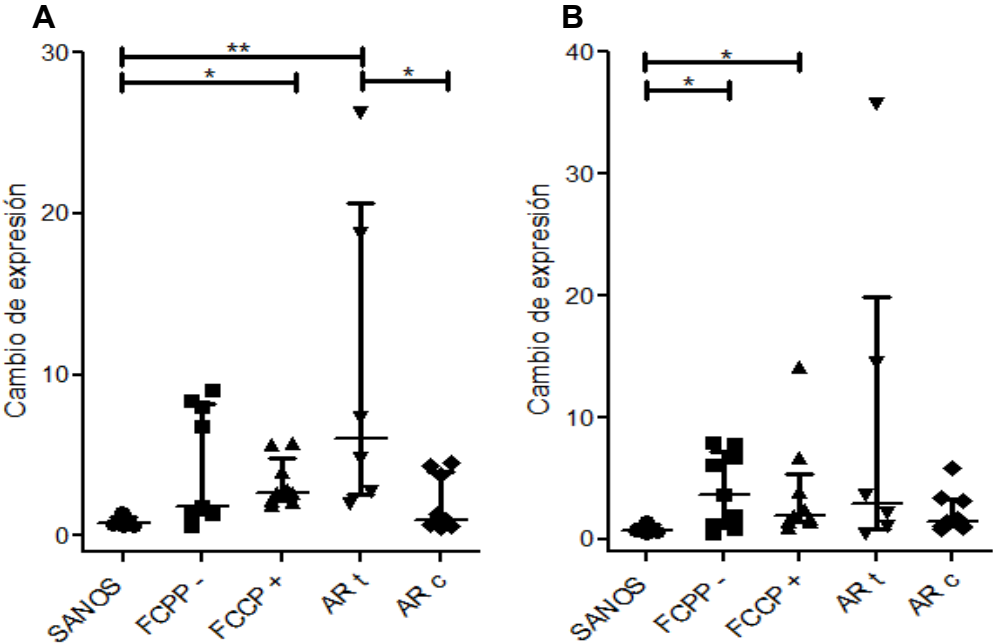


Figura 4

