



Departamento de Bioquímica Biología  
Molecular 3 e Inmunología  
Universidad de Granada

Instituto de Parasitología y Biomedicina  
"López-Neyra"  
CSIC

# **Contribución de CD38 al desarrollo de la artritis autoinmune inducida por colágeno en un modelo murino: estudios proteómicos y funcionales**

Programa de doctorado: Inmunología Molecular y Celular

Memoria presentada por el licenciado Antonio Rosal Vela para optar al  
grado de Doctor por la Universidad de Granada

Granada 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Antonio Rosal Vela  
D.L.: GR 669-2014  
ISBN: 978-84-9028-868-9



El doctorando Antonio Rosal Vela y los directores de la tesis Jaime Sancho López, Mercedes Zubiaur Marcos y Ramón Merino Pérez. Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Doctorando



Fdo.:

Director/es de la Tesis

Dr. Jaime Sancho López

Dra. Mercedes Zubiaur Marcos

Dr. Ramón Merino Pérez



Fdo.:



**Contribución de CD38 al desarrollo de la  
artritis autoinmune inducida por colágeno  
en un modelo murino: estudios proteómicos  
y funcionales**



# ÍNDICE

<b>A) RESUMEN.....</b>	<b>I</b>
<b>B) ABREVIATURAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>C) INTRODUCCIÓN</b>	
<b>I. CD38.....</b>	<b>3</b>
1. Descripción.....	3
2. Gen.....	6
3. Estructura cristalina del dominio extracelular del CD38 humano.....	7
4. Funciones.....	8
4.1 CD38 como ectoenzima.....	8
4.2 CD38 como receptor.....	12
4.2.1 Señalización a través de CD38 en distintos tipos celulares.....	13
5. Ratones deficientes para CD38 (Cd38 <sup>-/-</sup> ).....	16
5.1 Implicación de CD38 en la migración de neutrófilos.....	17
5.2 Implicación de CD38 en la migración de células dendríticas.....	18
5.3 Implicación de CD38 en el metabolismo de la insulina.....	19
5.4 CD38 y comportamiento social.....	20
5.5 CD38 en otros modelos de ratón.....	21
<b>II. ARTRITIS REUMATOIDE.....</b>	<b>22</b>
1. Introducción.....	22
2. Factores genéticos en la artritis reumatoide.....	22
3. Factores ambientales en la artritis reumatoide.....	24
4. Modelos animales experimentales de artritis reumatoide.....	24
4.1 Artritis inducida por colágeno, AIC .....	25
4.2 Artritis inducida por anticuerpos anticolágeno, AIAC.....	27
4.3 Artritis inducida por antígeno, AIA.....	27
4.4 Otros modelos de artritis inducida.....	28
4.5 Modelos de artritis espontánea por modificación génica.....	28



5.	Inducción de la inmunidad contra el colágeno tipo II.....	29
6.	Destrucción del hueso y cartílago.....	33
<b>III.</b>	<b>PROTEÓMICA.....</b>	<b>36</b>
1.	Introducción.....	36
2.	Métodos de separación.....	38
2.1	Electroforesis bidimensional en gel (2-DE).....	38
2.2	Técnicas cromatográficas.....	41
3.	Métodos de identificación y caracterización.....	42
3.1	Degradación de Edman.....	42
3.2	Espectrometría de masas (MS).....	42
3.2.1	Identificación de proteínas por Huella Peptídica (PMF).....	45
3.2.2	Identificación de proteínas mediante fragmentación de péptidos.....	45
4.	Métodos empleados en Proteómica de expresión diferencial.....	46
4.1	2-D DIGE.....	46
4.2	Proteómica cuantitativa no basada en gel.....	50
5.	Fraccionamiento del suero para análisis proteómico.....	51
6.	Otras técnicas empleadas en Proteómica.....	54
<b>IV.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>57</b>
<b>D)</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>69</b>
<b>E)</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	
1.	Obtención del suero.....	75
2.	Fraccionamiento de las muestras de suero.....	75
3.	Marcaje de las proteínas del suero para análisis proteómico 2D-DIGE....	75
4.	Electroforesis bidimensional en gel.....	76
5.	Digitalización de los geles y análisis de las imágenes.....	76
6.	Digestión de proteínas en gel e identificación de proteínas por PMF y MALDI-TOF/TOF.....	78
7.	Western-Blot.....	79
8.	ELISA .....	80

9.	Determinación de citoquinas en suero.....	80
10.	Análisis de poblaciones celulares mediante citometría de flujo.....	80
11.	Activación <i>in vivo</i> de células Inc.....	81
12.	Diferenciación <i>in vivo</i> hasta osteoclastos y detección de TRAP en sobrenadantes de cultivo.....	81
13.	Extracción de ARN de patas de ratón y análisis de la expresión génica mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) cuantitativa a tiempo real.....	82

## **F) RESULTADOS**

1.	Fraccionamiento de la muestra.....	87
2.	Clasificación de las proteínas identificadas.....	91
3.	Diseño experimental para análisis 2D-DIGE.....	92
4.	Análisis de las proteínas expresadas diferencialmente.....	93
5.	Análisis proteómico del suero de ratones en un modelo de Inflamación.....	105
6.	Análisis proteómico del suero de ratones sin inmunizar.....	108
7.	Western Blot.....	108
8.	ELISA.....	114
9.	Determinación de citoquinas en suero.....	117
10.	Células inmunitarias inflamatorias implicadas en el desarrollo de la AIC.....	120
11.	Influencia de CXCL12 en la movilización celular durante el proceso de inmunización.....	128
12.	Participación de las células iNKT e influencia sobre precursores de osteoclastos.....	130
13.	Implicación de CD38 en la diferenciación hacia osteoclastos.....	132

## **G) DISCUSIÓN.....135**

## **H) REFERENCIAS.....149**

## **I) CONCLUSIONES.....153**

**J) ANEXO I: Concentraciones séricas o plasmáticas de las proteínas identificadas en muestras de suero tras fraccionamiento con Proteiminer.**

**K) ANEXO II: Tabla de proteínas identificadas mediante MS.**

**L) ANEXO III: Tabla de proteínas identificadas mediante MS/MS.**

*Resumen*



Para el estudio de numerosas enfermedades humanas está aceptado de forma generalizada el empleo de modelos animales para profundizar en el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad y como plataforma para la comprobación de posibles dianas terapéuticas. Como modelo de la Artritis Reumatoide humana (AR), un modelo animal en ratón bien establecido es la artritis inducida mediante la inyección de colágeno heterólogo tipo II (AIC). La AR se trata de una enfermedad autoinmune y sistémica caracterizada por una progresiva degeneración de las articulaciones acompañada de inflamación con el resultado de la destrucción del hueso y cartílago. Aunque han sido descritos ciertos factores genéticos y ambientales que se asocian con la aparición de la enfermedad, la etiología de esta patología permanece desconocida y de ahí el interés en su estudio. En nuestro caso empleamos los ratones B6 que en el modelo de AIC presentan una gran semejanza a la AR humana en términos de progreso de la enfermedad, manifestaciones histológicas y respuesta de los fármacos antiartríticos más comúnmente usados. El objetivo general era determinar la contribución de la molécula CD38 al desarrollo de la AR en este modelo de artritis inducida comparando ratones silvestres (WT) con ratones deficientes para CD38.

La molécula CD38 es una glicoproteína transmembrana presente en numerosas células del sistema inmunitario caracterizada por su dualidad funcional al ser capaz de actuar como enzima y como receptor. Como enzima, CD38 cataliza la síntesis de cADPR y NAADP a partir de NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup> respectivamente, además de mediar la hidrólisis del cADPR hasta ADPR. La producción de estas moléculas regula la movilización de Ca<sup>2+</sup> con consecuencias en numerosos procesos biológicos como proliferación, metabolismo de la insulina, etc. En los ratones CD38ko, se ha descrito que la falta de la actividad enzimática de CD38 tiene consecuencias en la movilización y migración de neutrófilos, células dendríticas, etc. Como receptor, CD38 se relaciona con procesos de activación y proliferación en linfocitos T y se asocia con el TCR/CD3 en linfocitos T y con el complejo CD19/CD81 en linfocitos B para desempeñar su función receptora. Tanto debido al resultado de su acción enzimática como por su papel receptor, CD38 actúa como regulador de las respuestas inmunológicas innata y adaptativa pudiendo actuar en ocasiones como nexo entre ellas por lo que su estudio resulta de gran interés por el papel que pudiera tener sobre el desarrollo de esta afección artrítica autoinmune.

En un trabajo publicado en colaboración con los laboratorios de los Doctores Ramón Merino (CSIC) y Jesús Merino (Universidad de Cantabria) se demuestra que en comparación con los ratones WT, los CD38ko desarrollan una forma atenuada de la artritis inducida por colágeno. Esta menor afectación clínica estaba acompañada por una limitada inducción en articulaciones de citoquinas proinflamatorias y por un menor porcentaje de células NKT invariantes en bazo.

En la presente Tesis Doctoral se ha realizado una aproximación proteómica para determinar en el suero de ratones WT y CD38ko perfiles de expresión proteicos que explicaran la distinta respuesta ante la artritis inducida. Mediante análisis cuantitativo de expresión diferencial mediante 2D-DIGE y el análisis multivariante de las proteínas diferencialmente expresadas se pudieron definir una serie de proteínas relacionadas con inflamación, las apolipoproteínas y el complemento que resultaron de interés para catalogar los dos tipos de ratones en función de la respuesta ante la inmunización con Col.II+CFA. Por otro lado, se realizó un estudio proteómico de expresión diferencial en el suero de ratones WT y CD38ko inmunizados con CFA/IFA para determinar la implicación sobre las proteínas encontradas con expresión diferencial del adyuvante empleado en la inmunización con Col.II. Como resultado, surgieron algunas proteínas coincidentes con las halladas para la comparación entre los ratones inmunizados con Col.II+CFA pero algunas de ellas eran únicas para este último caso demostrando la distinta respuesta de los ratones WT y CD38ko a la artritis inducida por colágeno. Mediante ELISA y Western Blot se han confirmado las diferencias halladas entre ciertas proteínas como SAA, Ficolina-1 o IgG que además resultaron de utilidad para explicar el diferente *status* inflamatorio y clínico de la artritis inducida. El hallazgo de algunas citoquinas proinflamatorias en suero en los ratones WT frente a los CD38ko apoya este supuesto.

Previamente a los estudios proteómicos de expresión diferencial en suero se realizó un estudio sobre el fraccionamiento del suero mediante el empleo de un sistema de ecualización de la muestra basado en el empleo de librerías de hexapéptidos, conocido con el nombre de *Proteominer*. El amplio rango dinámico de concentraciones séricas provoca la necesidad de un fraccionamiento de la muestra para aplicaciones posteriores ya que la presencia de una serie de proteínas con concentración mayoritaria limita la detección de proteínas poco abundantes que pueden ser funcionalmente relevantes o actuar como biomarcadores. Mediante el

empleo de este sistema de librerías se consiguió detectar e identificar en geles 1D y 2-D una serie de proteínas con una concentración en suero media y baja que en el suero sin fraccionar no pueden detectarse y que luego se han visto con expresión diferencial entre los ratones WT y CD38ko con la artritis inducida.

Por otro lado, se han realizado estudios de fenotipado de poblaciones linfocitarias en órganos linfoides y sangre durante el curso de la enfermedad, centrados sobre todo en monocitos y células de origen mieloide mediante marcadores específicos como CCR2 y CD184 que permitieron evaluar y establecer un patrón de respuesta celular ante la inmunización, permitiendo determinar cómo en los ratones WT la mayor sensibilidad al desarrollo de la artritis tenía reflejo sobre estas poblaciones celulares.

Además, se han realizado experimentos de diferenciación in vitro hasta osteoclastos y ensayos sobre el papel que la inducción de las células iNKT tienen sobre el metabolismo óseo y la generación de precursores de osteoclastos en médula ósea para intentar explicar los reducidos daños óseos en las articulaciones de ratones CD38ko respecto a los ratones WT en el modelo de artritis inducida.





# *Abreviaturas*



## Abreviaturas

- aa:** Aminoácido
- ACPA:** Anticuerpos antiproteínas citrulinadas
- ADN:** Ácido dexosirribonucléico
- AIA:** Artritis inducida por antígeno (*Antigen-induced arthritis, AIA*)
- AIC:** Artritis inducida por colágeno II (*Collagen induced arthritis, CIA*)
- AIAC:** Artritis inducida por anticuerpos anti-colágeno II, (*Collagen-antibody induced arthritis, CAIC*)
- ART2:** Mono ADP-ribosil transferasa 2
- ADPR:** Adenosin difosfato ribosa
- cADPR:** Adenosin difosfato ribosa cíclica
- BCR:** Receptor de célula B
- BSA:** Albúmina sérica bovina
- CFA:** Adyuvante completo de Freund
- DC:** Células dendríticas
- DIGE:** Electroforesis diferencial en gel (*Difference in gel electrophoresis*)
- EAE:** Encefalitis alérgica experimental
- EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
- ESI:** Ionización por electroespray
- fMLP:** Formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina
- FPR:** Receptor de péptidos formilados
- GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
- GPI:** Glucosilfosfatidilinositol
- GPCRs:** Receptores acoplados a proteína G
- HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa
- Ig:** Inmunoglobulina
- IFA:** Adyuvante incompleto de Freund
- IFN:** Interferón
- IL:** Interleuquina
- IP3:** Inositol trifosfato
- IPG:** Gradientes de pH inmovilizados en soporte plástico
- LES:** Lupus eritematoso sistémico
- LLC:** Leucemia linfocítica crónica
- LPS:** Lipopolisacárid

**MALDI:** Desorción/ionización láser asistida por matriz

**M-CSF:** Factor estimulador de la colonia de macrófagos

**MHC:** Complejo mayor de histocompatibilidad

**MS:** Espectrometría de masas

**MS/MS:** Espectrometría de masas em tándem

**m/z:** Ratio masa/carga

**NAADP:** Ácido nicotínico adenina fosfato dinucleótido

**NAD<sup>+</sup>:** Nicotinamida adenina dinucleótido

**NADP<sup>+</sup>:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**NICD:** Muerte celular inducida por NAD<sup>+</sup>

**NK:** Células *Natural Killer*

**PARP:** Poli ADP ribosa polimerasa

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PCA:** Análisis de componentes principales

**PGE2:** Prostaglandinas

**pI:** Punto isoeléctrico

**Pm:** Peso molecular

**PMF:** Huella peptídica o mapeo peptídico

**RANKL:** Ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa \beta$

**RyR:** Receptores de rianodina

**SAA:** Proteína sérica amiloide A

**SCID:** Inmunodeficiencia severa combinada

**SD:** Desviación estándar

**SDS:** Dodecilsulfato sódico

**SDS PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

**SELDI:** Desorción-Ionización por láser de superficie

**SIDA:** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

**TCR:** Receptor de célula T

**Treg:** Linfocitos T reguladores

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante  $\beta$

**TRAP:** enzima fosfatasa ácida tartrato resistente

**TRPM2:** Canal receptor de potencial transitorio 2 de la familia de la melastatina

**TOF:** Analizador de vuelo, *Time Of Flight*

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana

**WT:** Estirpe salvaje

# *Introducción*

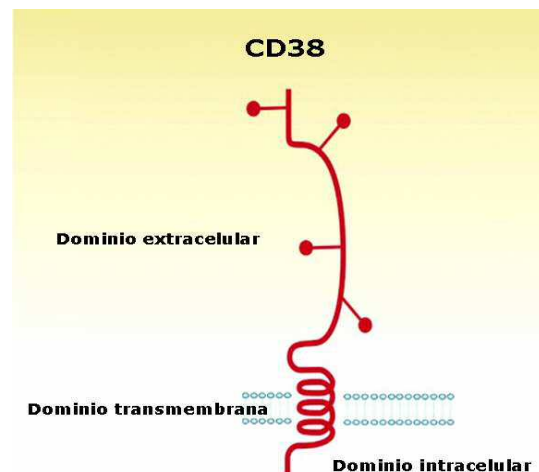


## I. CD38

### 1. Descripción

La molécula CD38 fue **identificada** por primera vez durante los primeros años de la década de los 80 gracias a los trabajos de E.L. Reinherz, englobados en la búsqueda e identificación de moléculas de membrana implicadas en el reconocimiento de antígenos [3]. Así, fue denominada en un principio como antígeno T10 hasta que años después le fue asignado el actual nombre de CD38. Inicialmente se identificaba como marcador leucocitario [4] aunque posteriormente fue descubierta su **amplia distribución en distintos tipos celulares** del sistema inmunitario: timocitos, linfocitos T activados, células plasmáticas, células "natural killer" (NK), monocitos, macrófagos o células dendríticas (DC) [5, 6]; y en **diversos tejidos**: médula ósea, páncreas, próstata, cerebro, riñón, músculo y ojo [7-9].

CD38 es una glicoproteína de transmembrana tipo II, formada por 300 aa y aproximadamente unos 45 kDa de peso molecular. Comprende tres dominios bien definidos: un dominio N-terminal citoplasmático (~21 aa), un dominio transmembrana (~22 aa) y un dominio C-terminal extracelular de mayor longitud (~257 aa).



**Figura 1.** Esquema de los dominios que componen la molécula CD38

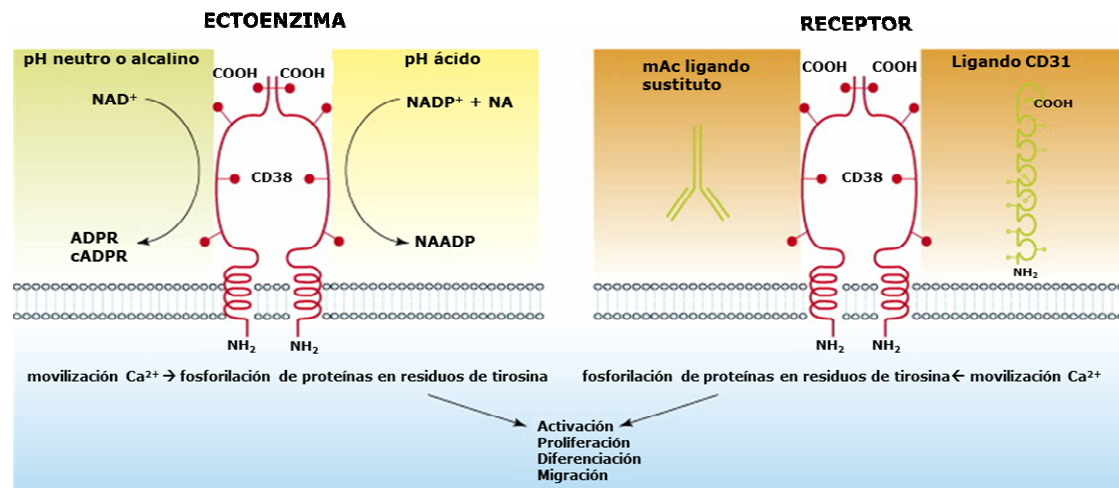
En la **membrana de la superficie celular**, CD38 puede encontrarse como monómero y como homodímero por uniones no covalentes. Experimentos recogidos en el trabajo de Moreno-García y col.[10] demuestran que en células murinas Ba/F3 la estabilidad del homodímero de CD38 se ve comprometida cuando se trunca la región citoplasmática o cuando se produce una mutación en un único aa dentro del dominio hélice  $\alpha 1$  que se encuentra presente en la región N-terminal citoplasmática.

Aun siendo identificada inicialmente como molécula de membrana en la superficie celular, posteriormente han aparecido distintos trabajos que demuestran que



CD38 puede localizarse en el **interior de la célula**; por ejemplo, en endosomas [11] y en el núcleo de células de rata [12], ratón [13] y humanos [14]. Recientemente también se ha propuesto un mecanismo que explicaría la exposición del sitio catalítico de CD38 al interior celular mediante un movimiento transversal o de *flip-flop* [15]. Además, se ha observado la presencia de CD38 en **forma soluble** en fluidos biológicos de individuos sanos (suero fetal y fluido amniótico) y de individuos con alguna patología (suero y líquido ascítico de pacientes de mieloma múltiple y en suero de pacientes con SIDA) [16]. Esta forma soluble de CD38 también se encuentra en el sobrenadante de cultivo de linfocitos T activados y de líneas celulares tumorales. La forma nativa soluble de CD38 es capaz de sintetizar e hidrolizar el cADPR con la misma ratio que la forma de CD38 de membrana. En nuestro laboratorio, un trabajo reciente de Zumaquero E. y col. [17] demuestra la presencia de CD38 en **exosomas** procedentes de células B linfoblastoides y su asociación con las moléculas señalizadoras CD81, Hsc-70 y Lyn. Descubrimiento confirmado de forma independiente por el grupo del Dr. Sánchez-Madrid en una publicación posterior [18]. En dicho trabajo demuestran también que existe un transporte unidireccional de CD38 (y otras moléculas como microRNAs) desde el linfocito T a la célula presentadora de antígeno. Este transporte está mediado por los exosomas que se secretan activamente por parte de los linfocitos T durante la formación de la sinapsis inmunológica.

**CD38** es bien conocida por su capacidad dual (**Figura 2**) para **actuar como ectoenzima y como receptor transmembrana** [19] aunque diversos trabajos publicados indican que ambas funciones pueden ser independientes una de otra [20]. Los estudios sobre la evolución de la familia de las ciclasas a la que CD38 pertenece parecen indicar que la función enzimática precede a la receptora, de manera que la adquisición de esta doble función pudiera dar lugar a una ventaja selectiva.



**Figura 2.** Dualidad de la molécula CD38 como ectoenzima y receptor

Adaptado de Deaglio S y col. [2]

El análisis de la expresión de CD38 se emplea actualmente como **herramienta diagnóstica** para ciertas enfermedades humanas. Por ejemplo, en la leucemia linfocítica crónica de células B (B-LLC), la alta expresión de CD38 se relaciona con una forma severa de la patología y empeoramiento del pronóstico [21]. En SIDA, la expresión de CD38 en células T CD8<sup>+</sup> y los valores absolutos de linfocitos CD4<sup>+</sup> en pacientes infectados de VIH permiten predecir la progresión de la enfermedad; la expresión de CD38 en esas células también resulta de utilidad por su correlación con la carga viral en la infección temprana por VIH y también se asocia con una menor supervivencia en individuos con un avanzado estado de la enfermedad [22, 23]. La disminución de la expresión de CD38 también se emplea como indicador de la efectividad de la terapia anti-retroviral (HAART). Además, el deterioro funcional del sistema CD38/cADPR ha sido asociado con la diabetes tipo 2, no insulina dependiente [24]. También se ha relacionado CD38 con otras patologías como mieloma múltiple y leucemia aguda promielocítica [25]. Un trabajo reciente de nuestro laboratorio demuestra que la expresión de CD38 en linfocitos T y los niveles de autoanticuerpos anti-CD38 en plasma sanguíneo correlacionan con un perfil de citoquinas y con una actividad clínica diferentes en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) [26].

## 2. Gen

CD38 forma parte de una familia de enzimas con **actividades NAD glycohidrolasa y ADP-ribosil ciclasa** [27]. Esta familia génica está evolutivamente muy conservada y engloba miembros descubiertos en organismos tan diversos como *Aplysia californica* (babosa de mar) [28], *Schistosoma mansoni* (parásito de mamíferos) [29] y en vertebrados como en humano (cromosoma 4) [30] y ratón (cromosoma 5) [31].

En humanos, CD38 está codificado por un gen de copia única de 62 kb y dividido en ocho exones y siete intrones, incluyendo un gran intrón que interrumpe la región 5'codificante. El exón 1 codifica para la región N-terminal, la región transmembrana y los primeros 33 aa de la región extracelular. El resto de exones (2 al 8) codifican el dominio extracelular. Se pueden distinguir varios niveles en la **regulación transcripcional** de la expresión de *Cd38*. El primer nivel se caracteriza porque en la región promotora está ausente la caja TATA y se encuentra una región o islaCpG (región con alto contenido en pares de citosina y guanina enlazadas entre sí por fosfatos); se considera que la metilación de estos sitios CpG en la región promotora inhibe la expresión del gen en cuestión y por el contrario al demetilarse se promovería su expresión. Además, los genes constitutivos tienen un alto contenido de CpG en su región promotora, mientras que los genes cuya expresión es específica de tejidos tienen un contenido de CpG relativamente bajo. En el caso de CD38 el contenido de CpG se extiende a una región de 900 pares de bases, es decir tiene un contenido de CpG alto, y además se ha observado que esta hipometilado en varias líneas celulares, lo que parece indicar que es un sitio muy potente en la regulación de la expresión de CD38 [32]. Un segundo nivel de control se encuentra “aguas arriba” de la región CpG, siendo un sitio potencial para la unión de factores de transcripción como el factor nuclear para IL-6 y el factor de transcripción 1 de células T) [33]. El tercer nivel de regulación se encuentra dentro del primer intrón del gen. El extremo 5' del intrón 1 contiene elementos de respuesta a ácido retinoico y su receptor [34] y de activación/proliferación de peroxisomas [35]. Además, en el intrón 1 aparece polimorfismo de nucleótido simple (SNP) donde se une el factor de transcripción E2A y cuyas variantes presentan diferente grado de expresión en leucemia linfocítica crónica [36]. En el intrón 3 aparece también una mutación puntual en posición 418 y junto con la mutación del intrón 1 en posición 182 se relacionan con la susceptibilidad y manifestaciones clínicas del LES [37].

Además de *Cd38*, dentro de esta familia de ADP-ribosil ciclasas se conoce otro miembro, ***Cd157***, que parece ser surgió como duplicación de *Cd38*. CD157 se encuentra anclada a membrana mediante glicosilfosfatidilinositol (GPI) y presenta una alta semejanza con *Cd38* en la estructura de los exones y de la proteína que codifica [32, 38].

### 3. Estructura cristalina del dominio extracelular del CD38 humano

Comparando las secuencias del dominio extracelular del CD38 humano, CD157 y la ciclasa de *Aplysia californica*, Liu y col. consiguieron obtener la estructura cristalina del dominio extracelular del CD38 humano [39]. Las principales conclusiones del trabajo del Liu y col gracias a la resolución de la estructura son:

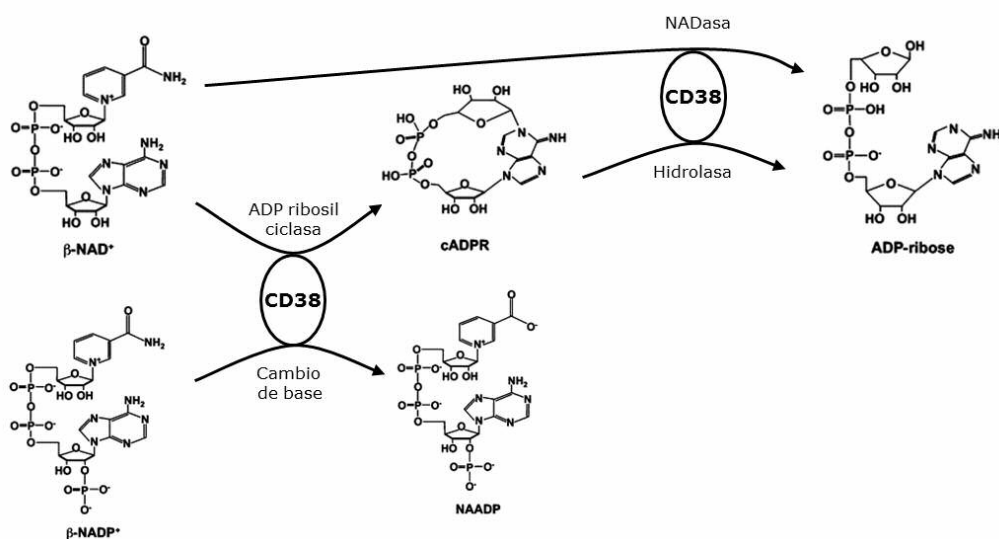
- Mediante mutagénesis dirigida, los residuos críticos del centro activo son: Glu<sup>226</sup>, Trp<sup>125</sup>, Trp<sup>189</sup> y Glu<sup>116</sup>.
- El reemplazo de Glu<sup>226</sup> por cualquier otro aa tiene como consecuencia la pérdida total de actividad enzimática [40].
- Los dos residuos de Trp parecen ser los responsables del posicionamiento del sustrato.
- La incubación de CD38 con NAD<sup>+</sup> produce predominantemente ADPR gracias a la actividad NAD-glicohidrolasa aunque también se produce una pequeña cantidad de cADPR mediante la ciclación del sustrato. El aa Glu<sup>146</sup> juega un importante papel en la regulación de las actividades ciclasa y NADasa de CD38 ya que al reemplazar este aa por Phe aumenta enormemente la actividad ciclasa a un nivel similar al de la actividad NAD<sup>+</sup> hidrolasa [41].

En relación con varios trabajos de nuestro laboratorio donde se describe la asociación de **CD38 con las balsas lipídicas** en linfocitos T y linfocitos B [17, 42]; la resolución de la estructura cristalina de CD38 permite refrendar estos hallazgos ya que la secuencia de aa RWRQTW del extremo N-terminal tienen cadenas cargadas positivamente próximas a la membrana plasmática que podrían interaccionar con las cargas hidrofílicas negativas de los lípidos de las balsas lipídicas.

## 4. Funciones

### 4.1 CD38 como ectoenzima

La función enzimática de CD38 fue objeto de estudio a partir del descubrimiento de la similitud entre una enzima ADP ribosil ciclasa del molusco *Aplysia californica* y el CD38 humano [43]. CD38 es una **enzima** multifuncional (**Figura 3**) que a partir de los sustratos **NAD<sup>+</sup>** y **NADP<sup>+</sup>** cataliza la formación de segundos mensajeros implicados en la regulación de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular, la ADP-ribosa cíclica (**cADPR**) y el ácido nicotínico fosfato adenina dinucleótido (**NAADP<sup>+</sup>**) movilizan el Ca<sup>2+</sup> intracelular y la **ADP-ribosa** está implicada en la entrada de Ca<sup>2+</sup> desde el exterior de la célula [19, 44]. La movilización del calcio tiene consecuencias en la activación de varias vías de señalización implicadas en distintos procesos biológicos como proliferación de linfocitos [45], procesos cardiacos [46], contracción del músculo intestinal longitudinal [47], liberación de glucosa en páncreas inducida por insulina [48], etc.



**Figura 3.** Actividades enzimáticas de CD38

Las capacidades enzimáticas de CD38 quedaron demostradas cuando se comprobó que una forma recombinante soluble de CD38 podía catalizar la formación e hidrólisis de cADPR [19]. Resultados similares se obtuvieron con el empleo de un anticuerpo monoclonal anti CD38 sobre membranas solubilizadas de eritrocitos demostrándose la existencia de tres actividades ectoenzimáticas: NAD glycohidrolasa (NADasa), ADP-ribosil ciclasa y cADPR hidrolasa [49].

Inicialmente, **cADPR** fue el metabolito generado por CD38 que suscitó mayor interés debido a su importancia fisiológica. La producción de cADPR por parte de CD38 representa sólo en torno al 1-3% del producto final generado por su actividad completando la ADPR el resto [19] por lo que podría deducirse que CD38 como ciclasa no es muy eficiente. Sin embargo, el estudio de los ratones deficientes para CD38 ( $Cd38^{-/-}$ ) demuestran que fisiológicamente la generación de cADPR por parte de CD38 puede tener un papel muy destacado [19] y participar de forma decisiva en la regulación de la secreción de insulina [50], en señalización mediada por receptores muscarínicos dependientes de  $Ca^{2+}$  en células pancreáticas acinares [51] y en quimiotaxis de neutrófilos en respuesta a fMLP [52], entre otros procesos.

La cADPR induce la liberación intracelular de  $Ca^{2+}$  desde reservorios de calcio por medio de receptores de rianodina (RyR) dependientes de calcio [53]. Se ha demostrado que en distintos tipos de células de mamíferos como células de músculo liso, células exocrinas y células neuronales, la estimulación con ligandos de distintos tipos de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) provoca la liberación de calcio mediada por cADPR mediante estos canales RyR [54]. Estos reservorios de calcio controlados por RyR son espacial, funcional y farmacológicamente distintos de los reservorios de calcio controlados por el inositol trifosfato (IP3) indicando que la movilización del calcio intracelular por parte de la cADPR se lleva a cabo de forma independiente de IP3 [54]. Además de la liberación, la cADPR tiene la capacidad para provocar la entrada de  $Ca^{2+}$  como fue demostrado con la microinyección de cADPR en la línea celular T Jurkat [55].

La **ADPR** es el principal producto generado por la actividad enzimática de CD38. Gracias a investigaciones de Perraud y col. se puso de manifiesto que la ADPR activa el canal TRPM2 (canal receptor de potencial transitorio de la subfamilia de la melastatina 2) al unirse al dominio Nudix [56]. Estos datos revelaron que la ADPR y el  $NAD^+$  actúan como mensajeros intracelulares y pueden jugar un importante papel en la entrada de  $Ca^{2+}$  mediante la activación de TRPM2 en células del sistema inmunológico [57].

El **NAADP<sup>+</sup>** (ácido nicotínico adenín dinucleótido fosfato) es un potente movilizador de las reservas de  $Ca^{2+}$  siendo generado por CD38 mediante el intercambio catalítico del grupo nicotinamida de  $NADP^+$  con ácido nicotínico (NA) [44, 58]. Este cambio de base tiene lugar a pH ácido lo que junto con su función fisiológica en la liberación de  $Ca^{2+}$  de compartimentos ácidos, sugieren que el  $NAADP^+$  actúa

como mensajero en orgánulos ácidos de la vía endocítica celular [59]. También se ha descrito que el NAADP<sup>+</sup> está implicado en liberación de Ca<sup>2+</sup> de lisosomas, endosomas y del retículo endoplasmático [60, 61]. La presencia de CD38 en endosomas de reciclamiento [11] presumiblemente con el dominio extracelular de CD38 hacia el interior del endosoma, podría facilitar la acción enzimática de CD38 sobre NAADP<sup>+</sup> una vez fusionados los endosomas con los lisosomas.

Es importante destacar que estos metabolitos procedentes de la actividad enzimática de CD38 pueden actuar de forma conjunta y potenciar el efecto que tienen sobre la movilización del calcio intracelular. Así, se ha observado que los canales TRPM2 que permiten la entrada de calcio desde el exterior incrementan su actividad por la acción sinérgica de la ADPR y cADPR [62]. Por otro lado, aunque altas concentraciones de la cADPR interfieren en la actividad de los canales TRPM2, a bajas concentraciones ocurre el efecto contrario, es decir, se potencia de forma significativa los efectos de la ADPR sobre la apertura de ese canal [62]. El metabolito NAADP<sup>+</sup> también aparece como activador de forma sinérgica junto con ADPR de la actividad de los canales TRPM2 [63] por lo que puede concluirse que la cADPR y NAADP<sup>+</sup> en combinación con ADPR son activadores de TRPM2 contribuyendo a la movilización de calcio y a distintas vías de señalización en células del sistema inmunológico.

Diversos estudios en ratón han puesto de manifiesto que existe un control de la homeostasis de los linfocitos T provocado por la muerte celular inducida por NAD<sup>+</sup> (NICD) mediante la ADP ribosilación de diversos sustratos tal y como se describe con más detalle en el apartado 5.3. La actividad enzimática de CD38 puede ser modulada por las enzimas ART (ecto-mono-ADP-ribosiltransferasas) cuando linfocitos T activados están en presencia de NAD<sup>+</sup>. La ADP ribosilación de CD38 en residuos de arginina da lugar a la inactivación de la actividad ciclasa e hidrolasa de CD38 mientras que la ADP ribosilación en residuos de cisteína provoca únicamente la inhibición de la actividad hidrolasa. Esta modificación en los residuos de arginina da lugar a un descenso en los niveles de cADPR intracelular con la consecuencia de una disminución en los niveles de Ca<sup>2+</sup> y la posterior muerte de los linfocitos T activados [64]. Una acumulación extracelular de NAD<sup>+</sup> provoca la ADP ribosilación del receptor purinérgico P2X7 y su activación ATP independiente iniciando un proceso de apoptosis inducida por NAD, que mencionábamos anteriormente [65]. Las enzimas ART actuarían como sensores y conversores de la concentración local extracelular de NAD<sup>+</sup> en los correspondientes niveles de proteínas de superficie ADP-ribosiladas

mientras que CD38 controlaría los niveles de proteínas celulares de superficie ADP ribosiladas limitando la disponibilidad del sustrato por parte de ART[66]. En este contexto, el NAD<sup>+</sup> podría actuar como citoquina proinflamatoria [67] estimulando los granulocitos humanos y reclutándolos hacia los sitios de inflamación en una acción mediada por el receptor purinérgico P2Y<sub>11</sub> sugiriendo una interacción funcional entre las ADPR ciclasas y los receptores purinérgicos [68].

El grupo de F. Lund ha descrito que el tratamiento de leucocitos con antagonistas para la cADPR (8Br-cADPR) o con el sustrato análogo del NAD<sup>+</sup> (8Br-NAD) es capaz de limitar el flujo de señalización dependiente de calcio con implicaciones en la respuesta quimiotáctica de diversas células frente a distintos estímulos como quimioquinas o quimioatrayentes [52, 69]. También demostraron que el antagonista de ADPR bloquea la transducción de señales a través de receptores de quimioquinas o quimioatrayentes y la quimiotaxis en leucocitos de ratón de manera que este compuesto bloquea el flujo de Ca<sup>2+</sup> en leucocitos activados a través de receptores de quimioquinas como el receptor para péptidos formilados (FPR). Además, también demostraron que PARP-1 no es necesario para la quimioatracción inducida por calcio o la quimiotaxis en estas células [70].

No sólo los productos de la actividad enzimática de CD38 resultan de interés ya que el sustrato de partida, el **NAD<sup>+</sup>** que es un metabolito central del metabolismo celular, también tiene gran importancia en la implicación de CD38 en la fisiología celular. Dos cuestiones a tener en cuenta es la accesibilidad de CD38 al NAD<sup>+</sup> al encontrarse en muy baja concentración en el exterior celular y que los productos de CD38 son generados en el exterior celular aunque su función pueda ser desempeñada en el interior. Se postula la existencia de transportadores de NAD denominados conexina 43 (Cx43) que movilizan el NAD<sup>+</sup> desde el interior celular donde la concentración está a nivel micromolar hacia el exterior donde en condiciones normales la concentración está en rango nanomolar [71]; y también la existencia de transportadores nucleosídicos que transportarían los productos generados, ADPR y cADPR, al citoplasma [72]. Incluso ha sido planteado que la propia molécula CD38 en su forma de homodímero podría actuar como transportador de cADPR y/o ADPR hacia el interior celular [73].

El grupo de Chini ha estudiado el papel de CD38 en el control de los niveles de NAD<sup>+</sup>, postulando que CD38 es la principal NADasa en células de mamífero para la regulación del NAD<sup>+</sup> intracelular [74]. Estos mismos autores han descrito la influencia



de CD38 en la modulación de la actividad de las sirtuinas que son enzimas desacetilasas dependientes de NAD<sup>+</sup> implicadas en envejecimiento, protección celular y metabolismo energético en células de mamífero y recientemente también se ha descrito la regulación CD38/sirtuina sobre el peso corporal en ratón [75]. Esta regulación tiene lugar en el núcleo y es llevada a cabo por las moléculas de CD38 presentes en la membrana nuclear interna [76].

#### **4.2 CD38 como receptor**

La primera evidencia sobre la función receptora de CD38 tuvo lugar al observarse que el anticuerpo monoclonal anti-CD38, IB4, inducía la proliferación de células mononucleares de sangre periférica humana. Este fenómeno es dependiente de IL-2 y actúa sinérgicamente con las vías de activación de CD2 y CD3 [77]. Experimentos posteriores con células linfocitarias también sugerían el comportamiento de CD38 como receptor de superficie en la membrana plasmática demostrando que CD38 estaba implicado en la transducción de señales de activación y proliferación [78]. Además, en linfocitos B de ratón el anticuerpo monoclonal anti-CD38, NIMR5, provocaba un incremento de Ca<sup>2+</sup> intracelular e inducía un aumento en la expresión de HLA de clase II [4]. El papel de CD38 como receptor quedó refrendado por el descubrimiento de un ligando específico, **CD31**, que provocaba además efectos muy similares que con los anticuerpos anti CD38 comentados anteriormente [79]. La primera evidencia de la existencia de este ligando sin naturaleza de sustrato proviene del uso de anticuerpos monoclonales anti CD38 que bloqueaban la adhesión de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup> a células endoteliales. Estos experimentos sugerían que CD38 es una molécula de adhesión que además forma parte de un complejo de señalización junto a otras proteínas como selectinas e integrinas, resultando de gran importancia para la migración leucocitaria a través del endotelio y para la proliferación celular. Además, la interacción CD38-CD31 no sólo es capaz de modular la adhesión sino producir también un incremento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular similar a los obtenidos mediante anticuerpos monoclonales anti-CD38 [80, 81]. La interacción entre CD38/CD31 ha sido estudiada tanto en células T como en células B, células NK o células mieloides, ya sea en situaciones normales como en situaciones patológicas siendo recogidos todos estos estudios de forma exhaustiva en la revisión de Deaglio y col. [82].

Otro ligando propuesto para CD38 es el ácido hialurónico, polisacárido que forma parte del tejido conectivo. CD38 presenta tanto en su dominio extracelular como en el dominio intracelular motivos de unión a ácido hialurónico [83].

En ratón no se han caracterizado ligandos para CD38. En ratones deficientes para CD38 se encontró que la respuesta inmunitaria humoral mediada por linfocitos B se encontraba alterada lo que podía sugerir la existencia en bazo de un ligando para CD38 que pudiera influir en la regulación la respuesta inmunológica [84]. Acerca de posibles ligandos para CD38 sólo aparecen los hallazgos de Hart y col., quienes usando una proteína de fusión para CD38 inmunoprecipitan dos proteínas en células dendríticas, una de 130 kDa y otra de 66 kDa como posibles candidatos [85]. La proteína de 130 kDa podría ser CD31 de ratón, aunque ni esta proteína ni la de 66 kDa han sido identificadas, más allá de determinar su peso molecular aparente en geles SDS-PAGE. Estos hallazgos no han sido confirmados por ningún otro grupo de investigación por lo que resulta interesante la búsqueda en ratón de otras moléculas que puedan ser potenciales ligandos de CD38 o bien ratificar las moléculas encontradas por Hart y col. y así profundizar en el papel de CD38 como receptor y las implicaciones fisiológicas tanto de CD38 como de sus hipotéticos ligandos. En este sentido, en este estudio la inyección in vivo de la proteína de fusión para CD38 (CD38 soluble) induce la expansión del tamaño y número de redes de células dendríticas foliculares e inhiben la producción de anticuerpos específicos de la subclase IgG2a en respuesta a la inmunización con KLH, sin afectar a la producción de anticuerpos anti-KLH de la subclase IgG1. Además, CD38 soluble induce la maduración de células dendríticas in vitro. Es decir, este nuevo ligando para CD38, que se expresa preferentemente en células dendríticas convencionales y foliculares, podría influir tras la unión a CD38 en la producción de anticuerpos específicos, en la maduración de las células dendríticas convencionales y en la expansión de redes de células dendríticas foliculares. En un estudio posterior del mismo grupo, demuestran que CD38 soluble induce la expansión y la vida media de linfocitos B memoria en los centros germinales, posiblemente por un mecanismo mediado por la expansión previa de las células dendríticas foliculares [86].

#### **4.2.1 Señalización a través de CD38 en distintos tipos celulares**

La función de CD38 como receptor ha sido estudiada en varios tipos celulares del sistema inmunitario donde dependiendo del tipo celular se establecen relaciones con distintos tipos de receptores celulares. La parte intracelular de CD38 es muy corta y

carece de dominios o secuencias que permitan augurar una función señalizadora importante. Sin embargo, esa función existe y ha sido corroborada en numerosas estirpes celulares tal y como será descrito a continuación en algunos ejemplos.

En el caso de los **linfocitos T humanos**, se demostró que existe una relación física y funcional de CD38 con el complejo TCR/CD3 [45]. Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la señalización temprana mediada por CD38 en linfocitos T es similar, aunque no idéntica, a la señalización inducida por el complejo TCR/CD3. En ambos casos se observó que la fosfolipasa C- $\gamma$ 1, ZAP-70 y Lck eran fosforiladas en tirosina, condiciones imprescindibles para que se produzca la movilización de calcio intracelular y la producción posterior de citoquinas [87]. Recientemente nuestro laboratorio ha contribuido de forma importante al estudio del papel de las balsas lipídicas en la iniciación de la vía de señalización de CD38. Las balsas lipídicas se consideran microdominios de membrana celular cuya composición lipídica es diferente a la de otras zonas de la membrana y que facilitarían la interacción con proteínas especialmente hidrofóbicas o que estuvieran asociadas con restos de glucofosfatidil inositol. La presencia de CD38 en las balsas lipídicas podría mejorar la capacidad de señalización de la molécula a través de esos microdominios de membrana ya que permitiría el reclutamiento de moléculas implicadas en señalización [42]. Las balsas lipídicas en los linfocitos T contienen altos niveles de CD38, Lck y la subunidad CD3- $\zeta$ , estando Lck asociado con CD38. La unión de un anticuerpo monoclonal a CD38 induce la fosforilación de LAT y Lck exclusivamente [88]. La importancia de Lck para la señalización de CD38 ha sido confirmada de forma independiente en experimentos donde se demuestra la asociación física entre la cadena citoplasmática de CD38 y el dominio homólogo de Src-2 de Lck [89].

Se ha descrito que la cola citoplasmática de CD38 no es necesaria para la inducción de la señal tras la estimulación de linfocitos B [90] por lo que se ha especulado que CD38 necesitaría utilizar la maquinaria de señalización de otras moléculas para desempeñar su función receptora. Pare ello había que demostrar que existe una interacción física y funcional de CD38 con moléculas señalizadoras que tengan ese cometido. En el párrafo anterior ya se han comentado los resultados obtenidos por nuestro grupo en linfocitos T. En el caso de los **linfocitos B humanos**, se propuso inicialmente que el complejo CD19/CD21 actuaría como un correceptor para CD38 [91]. Estudios posteriores del mismo grupo demuestran que es el complejo CD19/CD81 el realmente importante [92]. Otros autores han relacionado el BCR propiamente dicho con la señalización vía CD38, al menos en ratón [93]. Hay que

tener en cuenta, que tanto CD19 como CD81 también pueden asociarse física y funcionalmente con el BCR humano, por tanto estos estudios serían de alguna forma complementarios.

La región citoplasmática de CD19 presenta motivos de señalización en tirosina con capacidad para reclutar a Lyn y fosfoinositol 3-quinasa mientras que CD81, perteneciente a la familia de las tetraspaninas, es importante para la expresión de CD19 al actuar como chaperona y al permitir el acoplamiento de otros receptores y moléculas señalizadoras [94, 95]. La interacción entre CD38 y CD19/CD81 ha sido observada en balsas lipídicas y también en exosomas en un trabajo de nuestro laboratorio [17, 21]. Recientemente se ha demostrado de forma independiente en ratón que la interacción física entre CD38, CD19 y CD81 sucede de forma similar a lo descrito en humanos [96]. Según estos mismos autores la interacción de CD38 con CD19 no sería necesaria para inducir proliferación en linfocitos B vía CD38, ya que en ratones deficientes para CD19 los linfocitos B proliferan perfectamente en respuesta a anticuerpos anti-CD38 [96]. Sin embargo, no han testado la influencia de CD81, por lo que no se puede descartar que en ausencia de CD19, CD38 se asocie, en cooperación con CD81, con otras moléculas señalizadoras que compensen la ausencia de CD19. Hay que tener en cuenta que la tetraspanina CD81, gracias a su capacidad de interacción en las balsas lipídicas con muchas moléculas señalizadoras, entre ellas tirosina-quinazas de la familia Src como Lyn, puede nuclear en torno a CD81 toda la maquinaria de señalización que conlleva a la proliferación de los linfocitos B [17].

También se ha descrito que en las balsas lipídicas de **monocitos humanos** existe una fuerte asociación funcional y física entre CD38 y las moléculas MHC de clase II. Además, la integridad de estos dominios es esencial para la correcta señalización de MHC de clase II y CD38. También se ha descrito que la molécula tetraspanina CD9 forma parte del complejo CD38/MHC clase II compartiendo una vía de activación en monocitos humanos [97]. La expresión de CD38 se incrementa por efecto de la citoquina proinflamatoria IFN- $\gamma$  y produciéndose a su vez un incremento en la actividad ADP ribosil ciclasa y actividad hidrolasa. Por el contrario, el LPS, TNF- $\alpha$  y GM-CSF no producen ningún efecto en la expresión de CD38 [97]. En monocitos humanos en reposo la señalización vía CD38 induce la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 [98].

En **células dendríticas**, CD38 se ha utilizado como marcador de activación aunque también se ha descrito su función receptora ya que la activación de células

dendríticas con anticuerpos monoclonales anti-CD38 induce la expresión de CD83 y la secreción de IL-12 [99]. También se ha descrito que en células dendríticas maduras derivadas de monocitos, CD38 está implicado en quimiotaxis y en migración transendotelial hacia CCL21. Además, CD38 se asocia en células dendríticas con CCR7, CD83 y CD11b y al igual que ocurre en monocitos, linfocitos T o linfocitos B, CD38 se localiza en las balsas lipídicas [100]. En células dendríticas de ratones deficientes para CD38 se ha observado que CD38 participa en la regulación de la inmunidad adaptativa controlando la señalización mediada por receptores de quimioquinas en estas células [101]. CD38, a través de la producción de cADPR y la movilización de  $Ca^{2+}$ , es necesario para la correcta quimiotaxis de células dendríticas maduras e inmaduras ante ciertos estímulos como CCL2, CCL19, CCL21 y CXCL12. En **neutrófilos** de ratones deficientes para CD38 se ha observado que CD38 controla la quimiotaxis de neutrófilos y actúa como regulador básico de la inflamación y la respuesta inmunológica innata [52].

En **células NK**, se ha observado que CD38 se asocia con CD16 formando un complejo de señalización, siendo un requisito necesario la existencia de un CD16 funcional para la correcta señalización vía CD38 [102]. CD38 se expresa en células NK activas y en reposo y su activación en células NK circulantes da lugar a un incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular, un incremento en la expresión de MHC de clase II y de CD25 así como la fosforilación en residuos de tirosina en moléculas como CD3- $\zeta$ , FcRI, ZAP-70 y c-Cbl. A más largo plazo la señalización vía CD38 incluye la producción de IFN- $\gamma$  y GM-CSF y la inducción de funciones efectoras citolíticas [103].

### **5. Ratones deficientes para CD38 (*Cd38*<sup>-/-</sup>)**

El laboratorio de Maureen Howard desarrolló ratones deficientes para CD38 (*Cd38*<sup>-/-</sup>, en inglés CD38 *Knock out* o CD38ko) para el estudio fisiológico *in vivo* de CD38 así como de los metabolitos (cADPR, ADPR y NAADP<sup>+</sup>) generados por CD38 como ectoenzima y que eran conocidos ya entonces por su capacidad para poder actuar como segundos mensajeros celulares [84]. La pregunta que quisieron responder estos autores, con la ayuda de los ratones deficientes en CD38, era si CD38, a través de estos tres metabolitos capaces de inducir la movilización de calcio, era a su vez capaz de regular determinadas respuestas inmunológicas. Uno de los primeros hallazgos fue constatar que en numerosos tejidos de los ratones CD38ko la actividad NADasa era prácticamente nula con una notable reducción en los niveles de cADPR. Igualmente, los niveles de NAD<sup>+</sup> están alterados en muchos tejidos aunque

las consecuencias fisiológicas no están aún muy claras [84, 104]. Sin embargo, la reducción en la concentración tisular de cADPR no es completa sugiriendo que CD157 y/u otros miembros no identificados pertenecientes a esta familia de enzimas con actividades NAD glycohidrolasa y ADP-ribosil ciclasa pudieran estar actuando compensado en parte la ausencia de CD38. El desarrollo de ratones doble deficientes para CD38/CD157 parece no haberse llevado a cabo con éxito por lo que para sustentar esta hipótesis se deberían intentar otros abordajes experimentales.

La ausencia de CD38 no afecta a la viabilidad ni a la capacidad reproductora por lo cual CD38 y su actividad enzimática no parecen ser esenciales para la vida del ratón, surgiendo de nuevo también la posibilidad de una posible participación compensatoria por parte de otras enzimas como CD157 con capacidad de desarrollar funciones enzimáticas muy similares a CD38. Esta aproximación inicial también permitió determinar que no siendo determinante para el desarrollo de los diferentes linajes hematopoyéticos, CD38 es necesario para una correcta respuesta humoral dependiente de células T.

### **5.1 Implicación de CD38 en la migración de neutrófilos**

El grupo de la Dra. Frances Lund ha llevado a cabo diversos estudios sobre la **respuesta inmunológica de los ratones *Cd38*<sup>-/-</sup>** bajo ciertas condiciones como por ejemplo ante **infecciones bacterianas del sistema respiratorio**. La pérdida de CD38 tiene como consecuencia una mayor susceptibilidad de estos ratones a infecciones bacterianas debido a la incapacidad de los **neutrófilos *Cd38*<sup>-/-</sup>** para migrar a los sitios de infección [52]. Cuando ratones *Cd38*<sup>-/-</sup> son infectados con la bacteria gram<sup>+</sup> *S. Pneumoniae*, el infiltrado celular resultante de la infección es reducido y las bacterias se diseminan rápidamente desde el pulmón a la sangre. Este trasvase ocurre de forma rápida y transcurridas 36h la mayoría de los ratones *Cd38*<sup>-/-</sup> no logran sobrevivir. Estos resultados permiten señalar la incapacidad de estos ratones para generar una respuesta inflamatoria innata que permita combatir la infección bacteriana.

La deficiente migración de los neutrófilos *Cd38*<sup>-/-</sup> al pulmón ante la infección se debe producir por una la falta de cADPR; molécula que directamente induce la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular y la entrada de Ca<sup>2+</sup> desde el exterior necesarios para la migración de los neutrófilos tras la estimulación con el quimioatrayente bacteriano fMLP [52]. Sin embargo, aunque los neutrófilos *Cd38*<sup>-/-</sup> son incapaces de migrar en respuesta a varios quimioatrayentes y quimioquinas como fMLP, MIP-1 $\alpha$  o la proteína

sérica amiloide A, son capaces de migrar correctamente ante otras quimioquinas como los ligandos CXCR1/2, IL-8 y MIP-2 [69] indicando que el defecto migratorio se manifiesta en respuesta a ciertas quimioquinas y no a otras. En un estudio posterior, estos autores han demostrado la participación de proteínas G triméricas específicas para uno u otro tipo de receptor de quimioquinas, descubriendo en concreto que la subunidad G $\alpha$ -q es necesaria para la liberación de calcio y la migración mediada por aquellas quimioquinas que a su vez dependen de la expresión de CD38 y de cADPR [105]. Este comportamiento es dependiente del tipo celular y, posiblemente, de su estado de activación.

## **5.2 Implicación de CD38 en la migración de células dendríticas**

La implicación de CD38 en la respuesta inflamatoria innata ante la infección por *S. Pneumoniae* se manifiesta al controlar esta molécula la movilización de los neutrófilos a través de los metabolitos inductores de la movilización de calcio generados por la actividad enzimática de CD38, Sin embargo, este defecto en la migración de neutrófilos por sí solo no parecía ser la única causa que explicara la deficiente respuesta inmunológica humoral observada en los ratones *Cd38*<sup>-/-</sup> en la que intervienen otros tipos celulares como células dendríticas entre otros. Así, un defecto migratorio de las **células dendríticas (DC)**, capaces de migrar desde la sangre a los tejidos periféricos y desde los tejidos periféricos a los nódulos linfáticos en respuesta a un estímulo inflamatorio, podría explicar la limitada respuesta observada [106]. En este sentido, en los nódulos linfáticos la respuesta inmunológica dependiente de células T está alterada en animales con defectos en las quimioquinas o en receptores de quimioquinas que inducen la migración de células dendríticas [107, 108].

Experimentos realizados por el laboratorio de la Dra. Lund determinaron que tal y como ocurre con los neutrófilos *Cd38*<sup>-/-</sup>, las células dendríticas *Cd38*<sup>-/-</sup> son intrínsecamente deficientes en su respuesta quimiotáctica ante ciertas quimioquinas [101]. A partir de células de médula ósea seleccionaron células dendríticas inmaduras y maduras de ratones salvajes (WT) y ratones *Cd38*<sup>-/-</sup> para ensayos de quimiotaxis. En experimentos realizados *in vitro* con DC inmaduras *Cd38*<sup>-/-</sup> se observa que estas células son incapaces de migrar en respuesta a CXCL12 (también llamado SDF-1, ligando del receptor CXCR4) y a CCL12 (también llamado MCP-1, ligando del receptor CCR2). De igual forma, DC maduras *Cd38*<sup>-/-</sup> tampoco migran de forma eficaz en respuesta a CCL19 y CCL21 (ligandos del receptor CCR7) y CXCL12. En este último caso, la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 y

sobreexpresión de CCR7 sugieren que la deficiente migración no se debe a una falta de maduración de las DC *Cd38*<sup>-/-</sup> en respuesta a TNF $\alpha$  [101].

Estos resultados fueron refrendados por experimentos *in vivo* donde queda demostrado que la movilización de células dendríticas desde la sangre a la piel es deficiente en los ratones *Cd38*<sup>-/-</sup>. Este tráfico hacia la piel desde la sangre necesita la participación del receptor CCR2 y mediante esta serie de experimentos ha quedado demostrado que la migración vía CCR2 es CD38 dependiente [101].

### **5.3 Implicación de CD38 en el metabolismo de la insulina**

También ha sido estudiado el rol que CD38 junto con el NAD<sup>+</sup>, PARPs y cADPR pudieran tener en el **metabolismo de la insulina** y el daño en las células pancreáticas  $\beta$ . En pruebas de tolerancia a glucosa se observó que ratones que sobreexpresaban CD38 presentaban niveles de insulina en suero superiores a los ratones del grupo control sugiriendo un papel de CD38 en el aumento en la liberación de insulina [109]. La conclusión general extraída de estos resultados era que el cADPR generado por la actividad de CD38, a través del Ca<sup>2+</sup> movilizado, tiene influencia en la secreción de insulina. Trabajos posteriores de este mismo grupo con ratones *Cd38*<sup>-/-</sup> demostraron la deficiente tolerancia a la glucosa y bajos niveles de insulina en suero por parte de estos ratones transgénicos respecto al grupo control. Este comportamiento anómalo es restituido si células  $\beta$  consiguen expresar el gen de CD38 incorporado a posteriori [50].

Esta relación entre CD38 y el metabolismo de la insulina ha seguido cobrando importancia de manera que en los últimos años, experimentos llevados a cabo en el laboratorio de Jim Johnson demuestran que las células  $\beta$  pancreáticas aisladas de ratones *Cd38*<sup>-/-</sup> tienen defectos en la respuesta de calcio a la estimulación por insulina y son más propensas a la apoptosis en respuesta a diferentes estímulos, incluyendo la falta de suero y altas concentraciones de glucosa [110]. En este contexto, Ed Leiter y col. han descrito que la diabetes se desarrolla más rápidamente en ratones *Cd38*<sup>-/-</sup> con un fondo genético NOD/Lt (modelo de ratón de diabetes) [111]. En estos experimentos también se demuestra que esta mayor susceptibilidad de los ratones NOD. *Cd38*<sup>-/-</sup> a tener diabetes puede revertirse cuando se elimina la ART2 específica de linfocito T (mono ADP-ribosil transferasa 2). Al igual que CD38, ART2 utiliza NAD<sup>+</sup> como sustrato aunque no produce metabolitos solubles [112]. Como fue comentado anteriormente, la enzima ART2 ADP-ribosila proteínas de membrana, incluyendo el receptor purinérgico



P2X<sub>7</sub> [65]. La ribosilación de P2X<sub>7</sub> por ART2 que se expresa específicamente en los linfocitos T naive, T reguladores y células NKT induce la activación de este receptor y el desencadenamiento de un fenómeno apoptótico conocido como muerte celular inducida por NAD<sup>+</sup> (NICD en sus siglas en inglés).

La pérdida de CD38 en los ratones NOD da lugar a una disminución en el número de células T reguladoras presentes en estos animales; sin embargo, este fenotipo se revierte en ratones a los que les falta CD38 y ART2 [111]. Esto no es demasiado sorprendente dado que las células T reguladoras son muy sensibles a la muerte celular inducida por NAD<sup>+</sup>(NICD) [113] y esta NICD dependiente de ART2 está aumentada en *Cd38*<sup>-/-</sup> principalmente debido a una mayor disponibilidad del sustrato por parte de ART2 [66]. Es razonable pensar que la eliminación de CD38 lleva a un incremento en la muerte de células reguladoras dando lugar a una respuesta autoinmune más agresiva, por otra parte, la expresión de ART2 se pierde en linfocitos T activados y por tanto no son susceptibles a NICD, lo que podría facilitar la expansión de linfocitos T autorreactivos. Además de esta disminución en el número de células T reguladoras también se ha observado una disminución en el número de células inmunoregulatoras “*natural killer T*” (NKT) [114]. Aunque el desarrollo acelerado de la diabetes en este modelo es muy evidente, no está claro si en humanos la pérdida o la inactivación de CD38 podría tener el mismo impacto en el desarrollo de la diabetes ya que los linfocitos T humanos no expresan un homólogo al ART2 de ratón [115].

#### **5.4 CD38 y comportamiento social**

Sin duda, uno de los descubrimientos más llamativos en los últimos tiempos respecto a CD38 y sus metabolitos es la relación encontrada entre CD38 y el comportamiento social y parental, y entre CD38 y el autismo [116].

Higashida y col. descubrieron el papel de CD38 y la cADPR en la regulación de la secreción hormonal en sus estudios con los ratones *Cd38*<sup>-/-</sup>. La disminución en estos ratones del cADPR y del Ca<sup>2+</sup> liberado influyen directamente en la secreción de la hormona oxitocina y no de otros neurotransmisores como la vasopresina o la dopamina [117]. La deficiencia en la liberación de oxitocina puede ser recuperada si se revierte la expresión de CD38 en la neurohipófisis. Esta dependencia de CD38-oxitocina tiene consecuencias en el cuidado de las hembras *Cd38*<sup>-/-</sup> hacia las crías y con desórdenes en la actividad locomotora lo que en humanos se ha identificado con alteraciones psiquiátricas [117-119]. Las alteraciones en el comportamiento social en respuesta a diversos estímulos se han observado que son muy similares, salvo ciertas

particularidades, entre los ratones *Cd38*<sup>-/-</sup> y los ratones deficientes para oxitocina y su receptor (*Oxt*<sup>-/-</sup> y *Oxtr*<sup>-/-</sup> respectivamente) siendo algunas respuestas indicios de autismo o desórdenes comunicativos [120, 121].

En humanos, la relación de la oxitocina en el comportamiento está ampliamente documentada [122, 123] y recientemente se ha encontrado una mutación en el gen de CD38 que se relaciona con el autismo y bajos niveles de oxitocina [120].

### **5.5 CD38 en otros modelos de ratón**

Existen numerosos ejemplos de empleo de los ratones *Cd38*<sup>-/-</sup> en diversos ámbitos de investigación entre los que podemos destacar los comentados a continuación. La implicación funcional de CD38 en el **metabolismo óseo** ha sido estudiada el grupo de M. Zaidi. CD38 se expresa en osteoclastos y osteoblastos siendo la principal enzima en médula ósea que utiliza el NAD<sup>+</sup>. Su papel fisiológico parece estar relacionado sobre todo con su actividad NADasa más que con su actividad ADP ribosil ciclasa [124].

La importancia de CD38 en la respuesta innata también se ha demostrado recientemente en un modelo de infección en ratón por *Listeria monocytogenes* donde la ausencia de CD38 determina defectos en la migración celular causando una desigual respuesta ante la infección entre los ratones de estirpe salvaje y los *Cd38*<sup>-/-</sup> [125].

Sobre la implicación de CD38 en la **contracción del músculo liso**, por ejemplo, en pulmón se ha observado que el sistema CD38/cADPR contribuye a mantener el tono del músculo liso de las vías respiratorias y la capacidad de respuesta a través de la movilización del Ca<sup>2+</sup> intracelular [126]. Se ha demostrado que CD38 en un modelo de exposición a IL-13 (citoquina implicada en la patogénesis del asma) contribuye a la elevada repuesta de las vías respiratorias incrementando la reactividad del músculo liso a agonistas contráctiles [127]. El papel fisiológico de CD38 también se ha estudiado en otros modelos como en músculo liso de corazón [128] o en vasos sanguíneos [129].

## II. ARTRITIS REUMATOIDE

Las **enfermedades autoinmunes** son una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en el mundo industrializado afectando entre el 3 al 8% de la población. De forma simple, la autoinmunidad se genera por la ruptura de la tolerancia a lo propio por parte del sistema inmunológico en un proceso aún no extensamente comprendido que engloba numerosas moléculas y células del sistema inmunitario. Aunque no está muy claro el mecanismo implicado, la participación de bacterias o virus patógenos en el desencadenamiento de la respuesta a lo propio podría provocar la ruptura de la tolerancia [130]. Se ha observado que en algunas patologías como psoriasis o LES en el contexto de una infección bacteriana se produce un desarrollo y empeoramiento de la enfermedad autoinmune [131]. Aunque en los últimos tiempos ha habido un notable desarrollo en los tratamientos y terapias, a largo plazo los progresos resultan cuestionables por lo que es necesario un mayor conocimiento de la patogénesis de los procesos autoinmunes [132].

### 1. Introducción

La **artritis reumatoide (RA)** es una enfermedad autoinmune sistémica asociada con progresiva discapacidad, complicaciones sistémicas, muerte prematura y elevados costes socioeconómicos. Afecta en torno al 1% de la población, más frecuente en mujeres que en hombres a razón 3:1 y se caracteriza por inflamación sinovial e hiperplasia (hinchazón), producción de autoanticuerpos (factor reumatoide y anticuerpos contra proteínas citrulinadas, ACPA), destrucción de hueso y cartílago y afecciones sistémicas en el sistema cardiovascular, pulmonar y desórdenes esqueléticos [133, 134]. Aunque la etiología es desconocida, parece ser que la combinación entre la predisposición genética y los factores ambientales son determinantes para el desencadenamiento de esta patología autoinmune [135].

### 2. Factores genéticos en la artritis reumatoide

Se ha observado que ciertos haplotipos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II) predisponen a los individuos portadores a desarrollar AR. La presencia de un conjunto de aa (QKRAA), llamado **epítipo compartido**, en la región *HLA-DRB1* aumenta la susceptibilidad a la enfermedad [136]. Este descubrimiento sugiere que cierta predisposición en la selección del

repertorio de células T, en la presentación antigénica o en la afinidad hacia ciertos péptidos, podrían promover una respuesta inmunitaria adaptativa autorreactiva. Otras posibles explicaciones para entender esta relación entre el epítipo compartido y la AR podrían ser: el mimetismo molecular entre el epítipo compartido y alguna proteína microbiana, un aumento en la senescencia de las células T inducida por la presencia del epítipo compartido en moléculas del MHC o una potencial función como señalizador proinflamatorio que no se relaciona con el papel del epítipo compartido en el reconocimiento antigénico [137, 138].

Dentro de la población europea se ha asociado la presencia de un polimorfismo en el gen *PTPN22* con el riesgo a desarrollar AR. En individuos asiáticos no se encuentra este polimorfismo pero sí aparece uno en el gen *PAD14*, no presente en caucásicos, que codifica para la enzima peptidil-arginina-deiminasa 4 que es la responsable de la citrulinación de proteínas. Otros genes también identificados con posible influencia en la predisposición a AR son los que codifican para STAT4 y CD40 [139].

También se ha señalado la importancia que la **epigenética** podría tener en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes al actuar como modulador de la expresión génica. Por ejemplo, se han observado patrones de expresión diferencial de metilación específicos de artritis con numerosos loci de hipometilación o hipermetilación en genes relacionados con artritis. Como ya se ha comentado en otro apartado la hipometilación de las regiones promotoras se asocia a un incremento de la expresión génica y en este estudio se observó que las hipometilaciones afectaban a genes que se podían agrupar en vías de señalización relacionadas con migración celular, adhesión local, migración transendotelial e interacciones con la matriz extracelular que podrían contribuir y alterar la patogénesis de la AR [140].

Aunque existe una fuerte asociación entre ciertos genes y una mayor predisposición a desarrollar AR, la tasa de concordancia entre gemelos monocigóticos es sólo del 15%. Se asume entonces que el componente genético determina en torno al 50% de la probabilidad de desarrollar AR mientras que el resto depende del componente ambiental [141].

### **3. Factores ambientales en la artritis reumatoide**

El **componente ambiental** se considera junto con la herencia genética como los causantes del desencadenamiento de la afección autoinmune. Se han relacionado infecciones de origen vírico y bacteriano (virus de *Epstein-Barr*, citomegalovirus, género de bacterias *Proteus*, *E.coli*, etc) y sus productos (por ejemplo, proteínas de choque térmico) con la AR y aunque el mecanismo de actuación no está muy claro, parece ser que algún tipo de mimetismo molecular podría explicar esta relación [142]. La formación de inmunocomplejos durante la infección podría inducir la aparición del factor reumatoide, autoanticuerpos de alta afinidad contra la porción Fc de las inmunoglobulinas que están implicados en la patogénesis de la AR y que además se utilizan en clínica como marcador diagnóstico.

Un ejemplo bien descrito es el de la bacteria causante de la peridontitis *Porphyromonas gingivalis*. La infección por esta bacteria causa la citrulinación de proteínas en el tejido gingival, la activación de una respuesta de células T contra las proteínas citrulinadas seguido de una activación de las células B y la producción de anticuerpos contra los antígenos proteicos citrulinados (ACPA). Un proceso inflamatorio posterior puede provocar la citrulinación de proteínas en las articulaciones y como consecuencia de la presencia de ACPA circulantes se producen inmunocomplejos en las articulaciones con la perpetuación de la inflamación local y el posterior desarrollo de artritis reumatoide crónica [143]. También se han relacionado cambios en la microbiota intestinal con el desarrollo de procesos autoinmunes y su posible papel desencadenante en la producción de autoanticuerpos, siendo un campo de estudio de plena actualidad [144].

También se ha asociado el tabaquismo con un mayor riesgo en el desarrollo de AR ya que se podría producir la citrulinación de proteínas en los pulmones y algunos componentes del tabaco podrían actuar como inmunoadyuvantes [145]. La polución derivada del tráfico también se considera que aumenta el riesgo para desarrollar AR aunque el mecanismo desencadenante todavía no se ha dilucidado [146].

### **4. Modelos animales experimentales de artritis reumatoide**

Los **modelos animales** han sido ampliamente usados en el estudio de la patogénesis de la artritis reumatoide. A pesar de las evidentes limitaciones, el empleo de estos modelos animales (ratón, rata, conejo, perro, mono) ha permitido un gran

avance en el conocimiento de los mecanismos de desarrollo de la enfermedad, además, de servir como plataforma para el desarrollo y comprobación de posibles terapias que puedan ser exportables a la afección en humanos [147].

Las ventajas de la investigación de una enfermedad en modelos animales son numerosas, entre las que cabe destacar, la reducción de la heterogeneidad de las muestras en estudio al tratarse de animales genéticamente homogéneos y la posibilidad de realizar las investigaciones en un ambiente totalmente controlado por el investigador. La heterogeneidad genética del estudio en humanos permite establecer su variabilidad y suele ser útil en cuanto a la identificación de biomarcadores predictivos de la enfermedad y potenciales dianas terapéuticas pero en numerosas ocasiones dificulta una traslación preclínica de los hallazgos. De igual forma, ningún modelo animal representa una semejanza total a lo que sucede en humanos en términos del desarrollo de la patología o respuesta a un posible tratamiento. En la mayoría de los casos, el modelo animal refleja aspectos específicos de la enfermedad y puede variar de un animal a otro (por ejemplo, entre rata y ratón) y entre distintas estirpes dentro de una especie determinada (C57/BL6 vs DBA/1 en ratón) [148]. La elección del modelo animal es, por tanto, compleja y debe atenderse a la disponibilidad del animal, finalidad de la investigación, etc.

El desencadenamiento de la AR y los factores que provocan la cronicidad de la enfermedad no son extensamente conocidos y esta fase, aun siendo crucial para el desarrollo de posibles terapias preventivas, no puede ser investigada en humanos necesitándose modelos animales que permitan aclarar los mecanismos desencadenantes y el desarrollo de la patología. Aunque en humanos el estudio de la AR ha permitido conocer la afección en las articulaciones dañadas, establecer elementos diagnósticos (autoanticuerpos, proteínas citrulinadas) y algunas terapias (Rituximab), la limitación en la obtención de ciertos tejidos (médula ósea, ganglios linfáticos, bazo) muy importantes en el desencadenamiento de la respuesta autoinmune y el desarrollo de terapias más eficaces, implican la necesidad del uso modelos animales para el completo conocimiento de la AR [149].

#### **4.1 Artritis inducida por colágeno, AIC**

De entre todos los modelos animales de la AR humana, la **AIC es el modelo más empleado**. En 1977 Trentham y col. describieron la primera inmunización de ratas con una emulsión de colágeno tipo II de origen humano, pollo o rata y adyuvante

completo de Freund (CFA), resultando un proceso autoinmune contra el colágeno propio de la rata que derivaba en una poliartritis erosiva [150]. Posteriormente otros grupos de investigación describieron protocolos similares para la inducción de la artritis en ratón [151] y en primates [152].

Como sucede con la AR en humanos, la **susceptibilidad** a desarrollar la AIC en ratón se relaciona con la expresión de un determinado MHC de clase II, que en ratón se denomina complejo H-2. Las estirpes de ratón susceptibles de desarrollar la AIC pertenecen a los haplotipos: H-2<sup>q</sup> (por ejemplo, los ratones DBA/1 y B10.Q), H-2<sup>r</sup> (ratones B10.RIII) y H-2<sup>b</sup> (ratones C57BL/6) [153-155]. Inicialmente, algún trabajo publicado señalaba la resistencia de la estirpe C57BL/6 a desarrollar CIA debido a defectos en la respuesta inmune secundaria [156] pero más recientemente son numerosos los trabajos publicados donde esta estirpe es la empleada como modelo de AIC en diversos contextos. A destacar los numerosos trabajos publicados por Inglis y col. donde se pone de manifiesto que la AIC desarrollada en ratones B6, pese a ser de menor incidencia que la desarrollada por la estirpe DBA/1, presenta una mayor cronicidad y una respuesta de los linfocitos T más persistente. El modelo de AIC desarrollado en ratones B6 también presenta una mayor semejanza a la AR humana en términos de progreso de la enfermedad, manifestaciones histológicas y respuesta de los fármacos antiartríticos más comúnmente usados [153]. Un buen ejemplo del empleo de los ratones C57BL/6 es el trabajo publicado por nuestro laboratorio en colaboración con los grupos del Dr. Jesús Merino (Universidad de Cantabria) y del Dr. Ramón Merino (CSIC, Santander) donde se pone de manifiesto que ratones deficientes para CD38 desarrollan una forma atenuada de AIC acompañada de una limitada inducción de IL-1 $\beta$  e IL-6 en articulaciones por una falta de expresión de IFN- $\gamma$  en articulaciones y por el reducido porcentaje de células NKT invariantes (iNKT) en bazo [157].

Aunque el modelo de AIC no representa completamente la AR humana, las similitudes son diversas y engloban distintos aspectos de la patología. En ambos casos se trata de una afección poliarticular, con una susceptibilidad dependiente de las moléculas presentadoras de antígeno, la afección de las articulaciones comprende hiperplasia, infiltración celular de células inmunológicas, formación del *pannus*, destrucción del hueso y cartílago, y comparten algunos marcadores serológicos (factor reumatoide, anticuerpos anticolágeno, anticuerpos antiproteínas citrulinadas). Sin embargo, difieren en algunas cuestiones como la afectación asimétrica y, dependiendo de la estirpe de ratón, una cronicidad más transitoria en el caso de la AIC; mientras

que en la AR la afectación de las articulaciones es simétrica y la patología se convierte completamente en crónica [158]. También se pensaba que a diferencia de la AR, en el modelo de AIC no se apreciaban manifestaciones sistémicas de la enfermedad aunque recientemente algún trabajo publicado contrarresta esta suposición [159]. Considerando todas estas cuestiones, la AIC como modelo animal de la AR humana es de gran utilidad para el estudio de la inflamación, autoinmunidad, artritis y destrucción del hueso y cartílago de las articulaciones.

#### **4.2 Artritis inducida por anticuerpos anticolágeno, AIAC**

De forma similar a lo que sucede en la AR, en el suero de ratones artríticos se detectan anticuerpos anticolágeno II y la transferencia de este suero a ratones no inmunizados induce la aparición de artritis [160]. Este hecho demuestra la participación de la inmunidad humoral en el desarrollo de la artritis mediante el reconocimiento de epítomos concretos del colágeno tipo II que es el colágeno predominante en las articulaciones [161]. De forma similar, se ha observado que la administración de una mezcla de anticuerpos anticolágeno es capaz de inducir la aparición de artritis [162]. Recientemente, se ha publicado un trabajo donde se demuestra que la administración combinada de varios anticuerpos monoclonales anticolágeno II pero dirigidos a epítomos distintos del colágeno II induce el desarrollo de la artritis de forma más eficiente [163]. El desarrollo clínico de la AIAC es muy similar a la de la AIC y la AR pero en el primer caso se caracteriza por predominar el infiltrado de macrófagos y células polimorfonucleares inflamatorias en las articulaciones [164] y por la menor dependencia de la respuesta de células T y células B, aunque la administración de células T específicas reactivas contra colágeno II provoca el incremento de la severidad de la artritis [165]. El modelo de la AIAC es muy útil para estudiar la contribución de los autoanticuerpos en el desarrollo de la AR y para el estudio del componente inflamatorio de la enfermedad.

#### **4.3 Artritis inducida por antígeno, AIA**

La inducción de la artritis se produce por la inmunización de los ratones con un determinado antígeno (por ejemplo, albúmina bovina sérica metilada en adyuvante completo de Freund) seguido de la inyección intraarticular con el mismo antígeno [166]. El proceso patológico implica inflamación mediada por inmunocomplejos con una respuesta articular mediada por células T. Este modelo no representa la ruptura



típica de la tolerancia en la patogénesis de la AR y su aplicación como modelo experimental de la AR es limitada [149].

#### **4.4 Otros modelos de artritis inducida**

Se ha descrito que la inoculación de ciertas moléculas procedentes de microorganismos e incluso bacterias patógenas es capaz de inducir el desarrollo de un proceso artrítico en ratón. Por ejemplo, la inyección intraarticular de **zimosan** (polisacárido de la pared celular de *S. cerevisiae*) en la articulación da lugar a una artritis inflamatoria, con infiltración de células mononucleares e hipertrofia, alcanzándose el pico de la enfermedad sobre el tercer día tras la inyección [167]. También en otros casos se ha descrito la aparición de artritis por la inyección intraperitoneal con **pristano**, que provoca una aguda respuesta inflamatoria seguida de una fase crónica menos severa [168]; y tras la inmunización con **proteoglicanos** derivados de cartílago humano en la estirpe de ratón BALB/c, altamente susceptible a desarrollar artritis [168].

En cuanto a las **bacterias**, la inmunización de ratones C57BL/6 por vía intravenosa con *Staphylococcus aureus* provoca la inducción de un proceso séptico que desencadena una artritis [169, 170]. La inmunización con *Borrelia burgdorferi* también induce una artritis caracterizada por tendinitis, hiperproliferación sinovial e infiltración de neutrófilos en las articulaciones. En este caso, la susceptibilidad al desarrollo de la artritis depende de la estirpe de ratón empleada desarrollando C3H una artritis muy severa, ratones C57BL/6 una artritis de severidad media y BALB/c desarrollan artritis en un espectro de afección muy variable [171].

#### **4.5 Modelos de artritis espontánea por modificación génica**

Ratones transgénicos que sobreexpresan **TNF- $\alpha$**  desarrollan poliartritis erosiva, inflamatoria y crónica y además, la incorporación de anticuerpos monoclonales contra el TNF- $\alpha$  humano provoca la protección contra la enfermedad [172]. Este modelo ha sido de gran utilidad para evaluar las terapias anti-TNF- $\alpha$  llevadas a cabo en humanos y para analizar el papel de citoquinas efectoras que regulan la inflamación y aquellas como RANKL que regulan la destrucción del cartílago y hueso.

Otro modelo de artritis espontánea es el de los **ratones K/xN**. Estos ratones desarrollan una artritis inflamatoria muy severa y destructiva, mediada por células T y

células B que generan anticuerpos contra la glucosa 6 fosfato isomerasa (GPI) y el suero de estos ratones puede ser empleado para el modelo de AIAC [173].

En el **modelo SKG**, una mutación puntual en el gen que codifica para la proteína ZAP-70 provoca una artritis inflamatoria debido en parte a defectos en la selección negativa en el timo de linfocitos T altamente autoreactivos que pueden incluir potencialmente linfocitos T CD4<sup>+</sup> artritogénicos. Este modelo es dependiente del ambiente donde se encuentren los ratones y no se produce en la ausencia total de gérmenes [174].

En los **ratones quimera SCID/humanos** se ha observado una artritis caracterizada por la destrucción del cartílago mediada por fibroblastos sinoviales. Para generar estos ratones quiméricos se ha implantado tejido sinovial humano de pacientes con AR junto con cartílago sano en ratones SCID [175].

En otros modelos de artritis espontánea como en **ratones deficientes para el receptor antagonista de IL-1**, desarrollan una artritis dependiente de estímulos ambientales mediada por una respuesta de linfocitos Th17 [176]. En ratones con una mutación homocigótica en el **receptor gp130** se induce una activación de STAT3 que provoca la aparición de una artritis inflamatoria destructiva [177]. El modelo **DR4-CD4 humanos en ratón** permite el análisis de la respuesta Th1 en el contexto de la molécula HLA-DR\*0401 siendo de utilidad para el estudio de los mecanismos implicados en la ruptura de la tolerancia que ocurren en el período de desencadenamiento de la AR [178]. Recientemente se ha descrito que en **ratones deficientes para la DNAasa II e IFN-IR** y en ratones con una delección inducida en el gen de la DNAasa II se desarrolla una poliartritis asociada con elevados niveles del factor reumatoide y de anticuerpos contra proteínas citrulinadas [179].

## **5. Inducción de la inmunidad contra el colágeno tipo II**

Tomando como base el modelo de la AIC, tras la inmunización de los ratones con la emulsión formada por el colágeno tipo II heterólogo (generalmente de pollo) y el adyuvante completo de Freund, las **células dendríticas** que capturan el colágeno II sufren un proceso de maduración gracias a los elementos patogénicos del CFA como el LPS y peptidoglicanos de micobacterias. Durante esta maduración las células dendríticas sobreexpresan la molécula MHC de clase II, receptores de quimioquinas, moléculas coestimuladoras y liberan citoquinas proinflamatorias. Las células

dendríticas activadas migran a los ganglios linfáticos para el procesamiento del colágeno II y la presentación antigénica vía MHC de clase II a linfocitos T inactivados o *naive* [180]. Aparte de la relación entre susceptibilidad a desarrollar AIC y el complejo H-2, la expresión de un restringido repertorio de moléculas del TCR también se relaciona con un mayor o menor capacidad para desarrollar la AIC [181].

Se postula que los **linfocitos T** en el modelo de AIC podrían desempeñar un papel destacado en la regulación inmunológica a través de la producción de citoquinas proinflamatorias y modulando la respuesta de los linfocitos B. La importancia de los linfocitos T queda manifiesta en varios trabajos donde se demuestra, por ejemplo, que la inoculación de linfocitos T específicos contra el colágeno II en ratones *naive* es capaz de inducir artritis [182] y que ratones deficientes para linfocitos CD4<sup>+</sup> desarrollan una artritis menos severa que los de estirpe salvaje; la deficiencia en linfocitos CD8<sup>+</sup> no parece afectar el desarrollo de la AIC [183]. La importancia de los linfocitos CD4<sup>+</sup> parece centrarse sobre todo en la fase inicial del desarrollo de la artritis aunque también se consideran necesarios para el establecimiento de la fase inflamatoria durante la cual aumenta el número de estos linfocitos. Considerándose de gran importancia durante la fase inicial, un aspecto no muy conocido es si los linfocitos CD4<sup>+</sup>artritogénicos reconocen un antígeno específico y si éste es un antígeno específico de las articulaciones. En modelos animales como en AIC y K/BxN el antígeno reconocido por los linfocitos CD4<sup>+</sup> está muy presente en las articulaciones aunque no específico de esta localización pero en otros modelos como en los ratones F759 para el desarrollo de la artritis no se necesita el reconocimiento de un antígeno específico de las articulaciones [184]. Incluso en algunos modelos como en los ratones SKG no se conoce cuál es el antígeno específico reconocido por los linfocitos CD4<sup>+</sup>. Es, por tanto, necesario desarrollar nuevos estudios para determinar la especificidad antigénica de los linfocitos CD4<sup>+</sup>y aportar nueva información acerca de cómo se produce la ruptura de la tolerancia inmunológica.

Los **linfocitos T reguladores** (Treg) desempeñan una importante labor en la prevención de la autoinmunidad. Tanto en humanos como en ratón, la pérdida de Foxp3 (factor de transcripción para la diferenciación y función de los linfocitos Treg) provoca el desarrollo de patologías autoinmunes multiorgánicas y de alta severidad [185]. El papel protector que desempeñan los linfocitos Treg se ha determinado utilizando varios modelos animales mediante experimentos de transferencia adoptiva y depleción y por manipulación genética o administración de anticuerpos [186-188]. Sin embargo, tanto en humanos como en ratón se ha observado que la artritis se

desarrolla aun existiendo linfocitos Treg [189, 190]. Esto sugiere que el número y/o función de los linfocitos Treg no tiene capacidad supresora suficiente frente a una inflamación muy potente y persistente localizada en el sinovio de la articulación. Es necesario profundizar en el conocimiento de la capacidad supresora de los linfocitos Treg bajo estas circunstancias y considerar que también podrían ser objeto de uso terapéutico ya que se ha visto que, por ejemplo, potenciando la expresión de CTLA-4 se consigue aumentar la capacidad supresora de los linfocitos Treg [191].

Se ha considerado que, tanto la AR como la AIC, son patologías asociadas a una **respuesta Th1** aunque este postulado ha cambiado en los últimos años gracias a varios hallazgos, algunos sorprendentes. El primero es que en estudios sobre el papel de IFN- $\gamma$ , citoquina considerada típicamente Th1, se obtuvieron resultados contradictorios con ese paradigma. Así, los ratones deficientes para el receptor de IFN- $\gamma$  no sólo no estaban protegidos al desarrollo de la AIC sino que ésta se producía de manera aún más severa que en ratones WT [192, 193]. El segundo elemento que acabó de trastocar el modelo Th1 fue el descubrimiento de un nuevo tipo de linfocitos T auxiliares o *helper*, los linfocitos Th17, capaces de producir IL-17 e IL-22. Como se describe en el siguiente párrafo estos linfocitos desempeñan un papel fundamental en la patogénesis de la AIC [194].

Los **linfocitos Th17** derivan de linfocitos T *naive* gracias a la estimulación de TGF- $\beta$ , IL-6 e IL-23 y por el contrario, esta diferenciación es suprimida por IFN- $\gamma$ . La IL-17 promueve la inflamación favoreciendo la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y RANKL [195]. El importante papel que los linfocitos Th17 tienen en la patogénesis de la AR en detrimento de los linfocitos Th1 también se apoya con el hallazgo de la presencia de IL-17 en el tejido sinovial de pacientes con AR [196] y los niveles relativamente bajos de IFN- $\gamma$  [197]. Se ha descrito en experimentos *in vitro* que la presencia de citoquinas inflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  y de citoquinas inmunosupresoras como TGF- $\beta$  promueven la diferenciación hacia Th17 [198]. En el sinovio de la articulación, la presencia simultánea del proceso inflamatorio y los linfocitos Treg para controlar esta inflamación crean un entorno ideal para el desarrollo de los linfocitos Th17. Varios estudios en el modelo de AIC también demuestran el importante rol que los linfocitos Th17 tienen en el desarrollo de esta patología ya que la administración de anticuerpos anti-IL-17 o bloqueando el gen para IL-22 se provoca una protección para el desarrollo de la enfermedad [199, 200]. Los linfocitos Th17 desempeñan una labor muy importante en el desarrollo de la artritis, tanto en la fase inicial e inflamatoria como a través de la activación de la inmunidad

innata. La IL-17 producida por los linfocitos Th17 u otras células en las articulaciones es un potente quimioattractante para los neutrófilos y, a su vez, los neutrófilos activados son productores de IL-17. En cualquier caso, un incremento local en la producción de IL-17 induce la activación de sinoviocitos y osteoclastos, lo que provocará una inflamación en las articulaciones con la consiguiente proliferación de sinoviocitos y destrucción del cartílago y del hueso.

El reclutamiento de linfocitos T y células dendríticas activados crean un entorno adecuado para el desarrollo de una inmunidad adaptativa contra el colágeno II y la activación de los linfocitos B *naive*. Además de la producción de autoanticuerpos como el factor reumatoide, ACPA y anticuerpos anticolágeno II, **los linfocitos B** contribuyen al desarrollo de la patogénesis de la AR y AIC mediante la liberación de ciertas citoquinas como IL-6 o actuando como células presentadoras de antígenos activando linfocitos T específicos [158]. Se ha demostrado que en ratones deficientes para linfocitos B no se puede desarrollar la AIC [201]. En humanos, que los linfocitos B juegan un papel destacado en el desarrollo de la patología se manifiesta con el exitoso resultado del tratamiento con Rituximab en pacientes con AR. Rituximab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína de membrana CD20, que se expresa en linfocitos B a lo largo de su desarrollo. La unión de Rituximab a CD20 induce la muerte por apoptosis de los linfocitos B (desde preB hasta linfocitos B maduros) sin afectar a las células plasmáticas productoras de anticuerpos, ni a los linfocitos proB. Con el tiempo se produce una regeneración del pool de linfocitos B y una paulatina pérdida de autoanticuerpos, es decir se produce una auténtica reeducación del sistema inmunitario [202]. La importancia de los anticuerpos anticolágeno II en el inicio y desarrollo de la respuesta inflamatoria articular resulta muy evidente en el modelo de AIAC como se detallará un poco más adelante. También queda manifestado este importante rol de los anticuerpos anticolágeno II en la capacidad para activar la cascada del **sistema del complemento**; la acumulación de estos anticuerpos en la región articular podría desencadenar la respuesta inflamatoria [203] y en ratón la deficiencia genética en algún componente del sistema del complemento determina la falta de desarrollo de la enfermedad, por ejemplo el componente C5 [204].

La activación de la cascada del complemento, especialmente C5a que surge del corte proteolítico de C5, provoca la movilización de **neutrófilos y macrófagos** que son activados a través de Fc $\gamma$ R y por ciertas citoquinas y quimioquinas como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, MIP-1 $\alpha$ , óxido nítrico y prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>). Estos factores también provocan la movilización e infiltración de otros muchos tipos celulares como

células NK, células dendríticas, linfocitos T y B y activan a los macrófagos y fibroblastos del tejido sinovial de la articulación. La importancia de neutrófilos y macrófagos en la patogénesis de la AIC queda demostrada en varios modelos animales donde, respectivamente, la depleción de neutrófilos y el bloqueo de la proteína quimiotáctica para granulocitos 2 (GCP-2) [205]; y la inhibición de TLR2 y TLR4 [206] en modelos animales de AR limitan el desarrollo de la artritis. La inmunidad innata puede actuar como un estimulador de la artritis y es necesaria para la activación de la respuesta inmunológica adquirida mediada por los linfocitos T y B. Incluso se ha observado que la hiperactivación de la respuesta innata por sí misma es suficiente para la inducción del proceso artrítico [207, 208].

## **6. Destrucción del hueso y cartílago**

En la patología de la AR, la inflamación crónica en la mayoría de los casos suele ir acompañada por destrucción del hueso. El tejido sinovial es un elemento activo donde el sistema inmunitario interfiere con la homeostasis normal del hueso. Recientemente ha sido acuñado el término osteoinmunología como un ámbito interdisciplinar de investigación para el estudio a nivel molecular de las relaciones entre el hueso y el sistema inmunitario [209].

En la articulación donde se va a producir el daño tisular las distintas células y moléculas efectoras trabajan de forma conjunta en un sistema capaz de iniciar y perpetuar la inflamación del tejido sinovial de la articulación que derivará en la **destrucción del hueso y cartílago (ver Figura 4)**. Los macrófagos sinoviales y células infiltradas liberan citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8) que a su vez inducen a la liberación de otras citoquinas como IL-23 y IL-17 y de enzimas como metaloproteinasas (MMP), elastasa y catepsina G por parte de sinoviocitos activados, condrocitos y células mononucleares infiltradas con la finalidad de destruir el colágeno de la matriz extracelular. El óxido nítrico producido por sinoviocitos y macrófagos provoca la degeneración de los condrocitos que son las células encargadas del mantenimiento del tejido cartilaginoso mediante la formación del colágeno tipo II. El colágeno II degradado por estas enzimas o procesado por células presentadoras de antígeno aumenta la respuesta inmunitaria específica anticolágeno con la activación de linfocitos T [180]. En el tejido sinovial también se produce en ciertos casos la formación de centros germinales ectópicos facilitados por la interacción entre células B y células residentes y también en cierto modo por el aislamiento espacial de la articulación y la presencia de autoanticuerpos anticolágeno tipo II [210]. Las citoquinas

proinflamatorias son las moléculas que conectan las células del sistema inmunológico con las articulaciones provocando la expansión de la fase inflamatoria en el desarrollo de la artritis.



Figura 4. Diagrama esquemático de una articulación de un ratón con AIC. Adaptado de [180]

La homeostasis del hueso se mantiene por un balance entre la continua actividad de resorción del hueso por parte de los osteoclastos y la formación de nuevo hueso por parte de los osteoblastos. En la AR, la actividad de destrucción ósea es la predominante por una hiperactividad de los osteoclastos. La liberación de citoquinas proinflamatorias y ciertos factores de crecimiento como M-CSF (factor estimulador de la colonia de macrófagos) inducen la expresión de RANKL y el incremento de la osteoclastogénesis y la actividad destructiva del hueso. **RANKL** es esencial para la diferenciación de los osteoclastos como queda demostrado en ratones deficientes para RANKL que presentan osteopetrosis (excesiva densidad del hueso) [211] y para la destrucción ósea en artritis como queda reflejado en modelos animales de AR [212]. RANKL es expresado por linfocitos T activados, linfocitos B y células sinoviales presentes en el sinovio articular con afectación de AR. Un asunto no resuelto es determinar qué tipo celular desempeña funcionalmente un papel más destacado como

fuelle de RANKL para la destrucción ósea que tiene lugar en la patología artrítica. Por su importancia en la osteoclastogénesis, RANKL ha sido propuesto como posible diana para evitar la destrucción ósea en pacientes con AR, así, ha sido demostrado como el empleo de anticuerpos antiRANKL resultan de utilidad para inhibir la destrucción de las articulaciones en pacientes con AR [213].

De manera destacada, tanto las citoquinas denominadas como Th1 y Th2 son inhibidores de la osteoclastogénesis mientras que se ha observado que *in vitro*, la citoquina IL-17 liberada por los linfocitos Th17 incrementa esta actividad [214]. La IL-17 actuaría promoviendo la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  que estimulan la osteoclastogénesis por medio de su efecto sobre las células precursoras de osteoclastos o indirectamente estimulando la expresión de RANKL por los fibroblastos sinoviales. Estos eventos de forma sinérgica promueven la resorción osteoclástica del hueso en el sinovio inflamado.

Como se ha mencionado anteriormente, los linfocitos Treg participan en la prevención de las respuestas autoinmunes, se infiltran en el sinovio de la articulación para proteger contra el daño tisular y promueven la liberación de citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- $\beta$ . En comparación con el conocimiento de su papel en la respuesta inflamatoria, no se conoce muy bien su participación en la destrucción del hueso. Se ha descrito que los linfocitos Treg tienen un efecto inhibitor sobre linfocitos T efectores o sobre células presentadoras de antígeno en un mecanismo que puede ser dependiente o independiente del contacto célula-célula [185]. Considerando que los osteoclastos derivan de la línea celular monocítica/macrofágica, ha sido publicado que los linfocitos Treg presentan la capacidad de inhibir la osteoclastogénesis vía RANKL aunque el mecanismo de acción no está muy claro y provoca cierta controversia [215, 216]. Aunque *in vitro* se ha demostrado que los linfocitos Treg pueden suprimir la osteoclastogénesis, el efecto inhibitor bajo la situación patológica debe ser aclarada ya que no queda muy claro si el efecto supresor se debe a una inhibición directa sobre los precursores de osteoclastos o de forma indirecta por la influencia sobre otros tipos celulares [217].



### III. PROTEÓMICA

#### 1. Introducción

El término **Proteómica**, acuñado por primera vez en 1995 por Wilkins [218], hace referencia al estudio de la estructura y función de las proteínas que constituyen una célula, órgano u organismo en un momento dado. Por **Proteoma** se entiende al total de las proteínas del sistema en estudio. Este campo de investigación ha emergido con gran fuerza en la era post-Genómica en parte para explicar las deficiencias en el estudio de las proteínas únicamente a partir de la información del genoma. Junto con otras disciplinas “ómicas” como la transcriptómica y la metabolómica es incluida por algunos investigadores dentro de la genómica funcional. El Proteoma a diferencia del Genoma es dinámico, con variaciones espacio-tiempo durante el desarrollo del organismo o célula en estudio; en un organismo superior por ejemplo, el Proteoma en cada momento y para cada tipo de célula será diferente. El dogma un gen-una proteína ya no es válido ya que cada gen puede codificar para varias proteínas distintas que resultan de diferentes procesos de ajuste, proteólisis o modificaciones post traduccionales (fosforilación, acetilación, glicosilación, desaminación, miristoilación...).

La investigación en Proteómica según la finalidad perseguida puede realizarse utilizando distintas aproximaciones experimentales como pueden ser: **Proteómica de expresión** que establece diferencias cuantitativas analizando proteínas expresadas diferencialmente entre muestras que difieren en alguna variable, por ejemplo, entre muestras de donantes sanos y pacientes lo que permite identificar biomarcadores con valor predictivo clínico de una enfermedad, alteraciones en el perfil proteómico debido a un tratamiento, etc.; **Proteómica funcional**, estudio y caracterización de un grupo determinado de proteínas con implicaciones funcionales, de asociación con otras proteínas y biomoléculas y también el estudio de las modificaciones postraduccionales; y una **Proteómica estructural**, sobre la localización subcelular de las proteínas y su estructura terciaria con la implicación en la formación de complejos funcionales.

Los estudios proteómicos se han englobado en dos categorías en función de la estrategia empleada. En los planteamientos de **arriba-abajo** (*top-down*), se introducen las proteínas intactas en el espectrómetro de masas y se fragmenta la proteína entera

de forma que se puede identificar una proteína con gran precisión de masa y con una cobertura de secuencia del 100%, preservando las modificaciones postraduccionales. De esta forma se pueden identificar distintas isoformas de una proteína y localizar con precisión diferentes modificaciones postraduccionales e incluso determinar la estequiometría de dichas modificaciones. La desventaja de este método es que por cada análisis se cubre solo una pequeña parte del proteoma, sobre todo si lo comparamos con los métodos basados en el análisis de péptidos. Además el coste de los espectrómetros de masas que se necesitan para este abordaje es todavía muy alto para la mayoría de los grupos de investigación [219]. La otra categoría engloba la aproximación de **abajo-arriba** (*bottom-up*) que también recibe el nombre de *shotgun*, se inicia con el tratamiento de la muestra con tripsina u otras enzimas para hidrolizar todas la proteínas y los péptidos son los que son analizados en el espectrómetro de masas. Para incrementar el rango dinámico de detección de las proteínas hay que proceder a diferentes técnicas de fraccionamiento de las mismas, ya sea utilizando geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) en una dimensión para separar en función del peso molecular, o en dos dimensiones en los que la primera separación es por isoelectroenfoque y la segunda por tamaño. En ambos casos, hay que eluir las proteínas del gel o proceder a la digestión enzimática in situ de las bandas o spots correspondientes. Como extraer proteínas de los geles es un proceso lento y no siempre muy eficiente, se han desarrollado métodos alternativos para no tener que utilizar geles. Uno de estos métodos, denominado tecnología multidimensional de identificación de proteínas (*MudPIT*), se basa en la separación de los péptidos trípticos por cromatografía líquida en dos dimensiones (intercambio iónico y fase reversa) acoplados en línea con el espectrómetro de masas. De esta formas aumenta considerablemente el número de proteínas identificadas en general y sobre todo de aquellas que por sus características de pI, tamaño o hidrofobicidad no son fácilmente detectables por los sistemas tradicionales [220]. La mayor limitación de estos métodos de enriquecimiento es la posibilidad de alterar la estequiometría de lo observado. También ocurre que normalmente los péptidos detectados no cubren toda la secuencia de la proteína, ya que hay ciertos péptidos que no eluyen de las matrices empleadas en su separación, o bien algunos péptidos no serán detectados nunca por proceder de proteínas poco abundantes. En resumen, los péptidos resultantes de la digestión tríptica se separan por cromatografía multidimensional y se identifican por huella peptídica o por fragmentación posterior (MS/MS) de los iones seleccionados. Para ello se utilizan motores de búsqueda (por ejemplo MASCOT) que comparan las bases de datos de proteínas o péptidos (UniProt, NCBI) y que permiten saber si los péptidos o fragmentos obtenidos corresponden a una proteína determinada con un grado de

fiabilidad muy grande ( $P < 0.05$ ). En general, las bases de datos están centradas en los genes que codifican para esas proteínas. En el caso de UniProt se selecciona una secuencia como la “canónica” y las demás se consideran isoformas. Sin embargo, esa clasificación no recoge toda la variabilidad inherente a las modificaciones transduccionales, polimorfismos por mutaciones puntuales, etc, que puede dar lugar a que una determinada isoforma acumule un número elevado de modificaciones (proteoformas).

A continuación se detallan brevemente las técnicas más empleadas en los procesos de separación e identificación de las muestras en estudios proteómicos y también las aproximaciones experimentales más usadas en estudios de Proteómica cuantitativa, ya sean basadas en gel (2D DIGE, electroforesis diferencial en gel, técnica desarrollada en las investigaciones de esta Tesis Doctoral) y las no basadas en gel o en solución (ICAT, SILAC, ...).

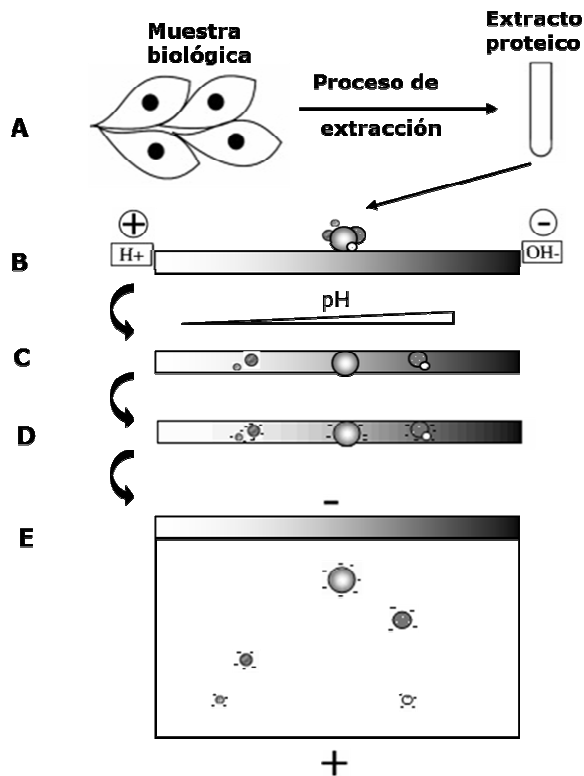
## **2. Métodos de separación**

### **2.1 Electroforesis bidimensional en gel (2-DE)**

De entre las técnicas de separación de proteínas la electroforesis bidimensional ha sido sin duda la más empleada y desarrollada en los estudios de Proteómica. En 1975, O’Farrell y col. [221] consiguieron una gran avance en la separación de una mezcla compleja de proteínas combinando dos técnicas ya empleadas en el estudio de las proteínas como son la separación de proteínas por electroforesis en presencia de SDS (**electroforesis unidimensional, 1-DE**, desarrollada por Laemmli en 1970) [222] y el isoelectroenfoque desnaturizante [223]; el resultado era notablemente superior que su empleo por separado. El desarrollo de diversas mejoras técnicas como las tiras con gradientes inmovilizados de pH (IPG) [224] permitieron mejorar notablemente la reproducibilidad, robustez y resolución de esta técnica y desde entonces ha sido muy utilizada en estudios proteómicos [1].

De forma sencilla (**ver Figura 5**), la electroforesis bidimensional comienza con la extracción de las proteínas de la muestra biológica en estudio en una solución compatible con los siguientes procesos de electroforesis (**A**), la muestra compleja de proteínas es incorporada a una tira con un gradiente fijo de pH (**B**) donde tras aplicar una corriente eléctrica las proteínas se desplazan a través del gradiente hasta localizarse en el punto donde alcanzan su punto isoelectrónico (**C**). La tira con las

proteínas incorporadas es equilibrada en un tampón con SDS que provoca que todas las proteínas tengan una carga negativa neta (D) y a continuación se dispone la tira en la parte superior de un gel SDS PAGE donde las proteínas son separadas según su Pm (E).



**Figura 5.** La electroforesis bidimensional consiste en la separación de las proteínas en una primera dimensión de acuerdo con su punto isoeléctrico (pI) y posteriormente las proteínas se separan en la segunda dimensión en función de su Pm. Adaptado de Rabilloud et al. [1].

La posibilidad de empleo de tiras IPG con distintos rangos de pH y tamaño para la 1ª dimensión y la variación de porcentajes, tamaño de gel, etc. en la segunda dimensión hacen del 2-DE una técnica de gran versatilidad para el usuario y prácticamente adaptable a la totalidad de muestras y posibilidades que se quieran estudiar. Existen además numerosos protocolos aplicables en todas las etapas del proceso que dependiendo de las características propias de la muestra en estudio posibilitan el abordaje proteómico del problema en cuestión. Ejemplos de protocolos detallados a este respecto pueden encontrarse en las siguientes referencias [225, 226].

Una vez realizada la separación de las proteínas en el gel, la **visualización** de las mismas en el propio gel puede realizarse por diversos métodos para su localización y posterior identificación por espectrometría de masas. La tinción con el colorante coloidal azul de Coomassie es de las más utilizadas por su fácil uso,

moderado coste y compatibilidad con posteriores análisis con MS pero resulta limitado en cuanto a sensibilidad y linealidad. También es muy empleada la tinción con plata, presenta una mayor sensibilidad que la anterior pero con los inconvenientes de una laboriosa utilización, menor homogeneidad y con problemas para ser empleada para cuantificación ya que algunas proteínas reaccionan de forma distinta que otras con los iones de plata. También se utilizan sistemas de tinción fluorescente (Cydyes, LAVAPurple, SyproRuby, etc.), marcaje con isótopos radioactivos e inmunodetección que presentan una mayor sensibilidad y mayor rango dinámico que los dos métodos inicialmente mencionados [227]. Tras la separación de las proteínas y su marcaje, se realiza la digitalización del gel y posterior análisis mediante distintos programas informáticos (Progenesis, DeCyder, PDQuest, etc.) que permiten la categorización y cuantificación de las manchas del gel que representan las proteínas de la muestra en estudio.

La separación por **electroforesis bidimensional** resulta de gran utilidad en múltiples campos de la investigación, como por ejemplo en estudios proteómicos en bacterias donde las limitaciones técnicas se ven solventadas por una menor complejidad de la muestra [228], también estudios en hongos [229], en análisis de enzimología donde el 2-DE se emplea como herramienta preparativa [230] y en inmunoproteómica donde la respuesta inmunológica puede detectarse a nivel proteómico o usarse el mismo gel 2-D para la detección de una proteína concreta por *Western Blot* mediante anticuerpos específicos [231]. También ha sido de gran utilidad en la aplicación para la búsqueda de biomarcadores en diversos tipos de cáncer como de pulmón [232], linfoma [233], o cáncer de próstata [234]. Otro ámbito de gran utilidad es el análisis de modificaciones postraduccionales como fosforilaciones o glicosilaciones ya que cuando éstas se producen pueden dar lugar a una variación en el pI o Pm de la proteína y provocar una variación en su patrón de migración en el gel 2-D. También es posible la detección de la modificación postraduccional en el propio gel 2-D mediante anticuerpos contra la modificación, por ejemplo proteínas citrulinadas [235].

A pesar de su gran utilidad, la electroforesis bidimensional presenta ciertas **limitaciones** a veces inherentes a la propia técnica o a la preparación de la muestra para su posterior aplicación. Algunas de esas limitaciones ya han sido mencionadas anteriormente: la visualización de las proteínas en el gel depende en gran medida del método de detección empleado, las tiras IPG para el isoelectroenfoque tienen una capacidad limitada de carga de proteínas y durante este proceso la presencia excesiva

de sales interfieren en la focalización adecuada de las proteínas. El rango de proteínas que pueden ser separadas en un gel 2-DE abarca aproximadamente desde 10 a 120 kDa con un sesgo hacia proteínas con pI neutro o moderadamente ácido. Las proteínas básicas o muy básicas (superior a pH 9.5) no focalizan bien en las tiras IPG y, por tanto no se resuelven bien en la primera dimensión. Las proteínas muy hidrofóbicas como pueden ser las de membrana presentan muchos problemas de solubilidad en tampones utilizados para la preparación de la muestra [236]. En estudios de expresión diferencial donde se comparan dos situaciones de una célula, tejido o pacientes para encontrar proteínas expresadas diferencialmente que puedan participar en procesos de regulación, de señalización o con una función relevante, estas proteínas pueden encontrarse en muy baja concentración en las muestras y a veces presentan mucha dificultad para ser visualizadas en el gel 2-DE ya que en la mayoría de los casos, las proteínas resueltas en mayor número se engloban en un limitado grupo de proteínas; del citoesqueleto, respuestas a estrés, del metabolismo celular, etc [237]. Un caso paradigmático de este suceso aparece en el caso del **suero**, muestra empleada en nuestro caso para estudios de Proteómica diferencial 2-D DIGE que precisa de un fraccionamiento previo a su aplicación electroforética para análisis proteómico de expresión diferencial tal y como será descrito de forma más detallada en el capítulo 5.

## **2.2 Técnicas cromatográficas**

Las técnicas cromatográficas son de los más potentes métodos de separación y permiten gran plasticidad gracias a características intrínsecas de las proteínas como su peso molecular, punto isoeléctrico, hidrofobicidad o bioespecificidad [226]. En este caso, el flujo de trabajo comienza con la digestión enzimática de la muestra, posterior separación de los péptidos e identificación de las proteínas de la muestra por espectrometría de masas. Entre los métodos cromatográficos más empleados basados en características físicas de las proteínas caben destacar el intercambio iónico, exclusión por tamaño, cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC) o electroforesis capilar. Otros métodos más selectivos son la cromatografía de afinidad mediante anticuerpos específicos o dianas específicas de las proteínas, y la cromatografía líquida acoplada a MS o MS/MS. Entre las ventajas del uso de la cromatografía líquida acoplada a MS respecto al sistema clásico de 2-DE/MS cabe destacar la mayor capacidad para identificar proteínas que están a baja concentración en la muestra y proteínas muy hidrofóbicas que tienen muchos problemas para incorporarse a las tiras IPG para el isoelectroenfoque de la 1ª dimensión. De forma

más reciente, aparece también la ya mencionada como cromatografía multidimensional acoplada a MS (*MudPIT*) que consiste en que los péptidos trípticos son sometidos a dos fraccionamientos cromatográficos acoplados entre sí y en línea con el espectrómetro de masas. La primera columna es de intercambio iónico y la segunda columna es de fase reserva.

### **3. Métodos de identificación y caracterización**

#### **3.1 Degradación de Edman**

Esta técnica desarrollada por Edman y Begg ha sido la primera empleada para conocer la secuencia de aa de una proteína [238]. Consiste en el marcaje en medio básico con feniltioisocianato del extremo N-terminal de un péptido provocando su inestabilidad e hidrólisis sin afectar al resto de enlaces peptídicos. El proceso, que puede ser llevado a cabo de forma automatizada por un secuenciador, se realiza de forma secuencial sobre el péptido resultante del tratamiento anterior pudiéndose determinar la secuencia de alrededor de 100 aa en una proteína desde su N-terminal. Aunque cada vez menos utilizada, esta técnica sigue siendo útil en el estudio de proteomas de especies en las que no se haya secuenciado todo el genoma, combinando la degradación de Edman con la secuenciación de novo por MS/MS[239].

#### **3.2 Espectrometría de masas (MS)**

La **espectrometría de masas** se ha convertido en el método de identificación empleado en la casi totalidad de los estudios proteómicos que actualmente se llevan a cabo sobre todo para la identificación de proteínas a gran escala debido a su rapidez y elevada sensibilidad. Como el propio nombre indica, se trata de determinar la masa molecular de una partícula cargada a partir de la ratio masa-carga ( $m/z$ ). Los grandes avances y extensión en las aplicaciones en el campo de la proteómica se deben a la mejora instrumental de las técnicas de MS. La MS en la investigación proteómica es una técnica ampliamente empleada para conocer la secuencia proteica de muestras desconocidas mediante la correlación entre la secuencia de los iones generados con la información de secuencia disponible en las bases de datos sobre proteínas. El análisis de muestras complejas mediante MS requiere de una concentración en torno a 0.1-10  $\mu\text{g}$  dependiendo del diseño experimental y del tipo de espectrómetro de masas disponible[240].

El espectrómetro de masas se divide de forma sencilla en tres partes: una **fente de ionización** que transforma los analitos en moléculas ionizadas, un **analizador** de masas que separa los iones generados en función de su  $m/z$  y un **detector** que registra los iones separados con su respectivo valor de ratio  $m/z$ . La separación de los iones se produce gracias a campos eléctricos y magnéticos en un espacio en el vacío para evitar la colisión entre los iones acelerados y las moléculas de aire. El analizador y del detector también deben encontrarse en el vacío aunque la fase de ionización puede realizarse a presión atmosférica en función de la fuente de ionización que se emplee.

El análisis de un analito mediante MS requiere de la ionización de la molécula y su incorporación en una fase gaseosa. El desarrollo a finales de 1980 de dos métodos de ionización suave, **ionización por electrospray (ESI)** y **desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI)** ha supuesto una revolución técnica de la MS ya que hace posible la ionización de moléculas de gran tamaño como pueden ser las proteínas, péptidos y nucleótidos y permiten la formación de iones sin una pérdida significativa de la integridad de la muestra. La importancia que estas técnicas han tenido en el campo de la MS y su repercusión en las aplicaciones queda de manifiesto al serles concedido a los desarrolladores Fenn y Tanaka el premio Nobel de Química en 2002. En la **ionización por MALDI**, los iones son generados mediante pulsos de láser aplicados a muestras en estado sólido embebidas en matrices cristalizables, la absorción de energía por parte de la matriz se convierte en energía de excitación y en transferencia de protones a la muestra lo que provoca su ionización y la desorción de los iones de fase sólida a gaseosa. En la **ionización por ESI** se produce una vaporización de la muestra en solución al pasarla a través de un capilar donde se aplica una alta diferencia de potencial. Posteriormente, los iones con carga se forman a partir del aerosol con gotas cargadas que al pasar a una zona de menor potencial son desolvatadas y las moléculas de la muestra son protonadas. Una de las ventajas del ESI es que permite que los iones adquieran múltiples cargas dependiendo de su estructura y masa molecular [226, 241].

En la parte del **analizador** se produce en vacío la separación de los iones en fase gaseosa según su ratio  $m/z$ . Entre los tipos de analizadores encontramos distintos tipos: el **analizador de tiempo de vuelo (TOF)**, el más asociado a la ionización por MALDI, los iones son acelerados en un campo eléctrico tras salir de la fuente de ionización y su valor  $m/z$  se determina mediante la medida del tiempo de vuelo en el vacío de estos iones desde que son acelerados hasta que impactan en el detector. El



**analizador triple cuadrupolo**, empleado sobre todo con la ionización ESI en la espectrometría de masas en tándem, en el primer espectrofotómetro se seleccionan los iones de interés que luego pasan a segundo espectrofotómetro donde se separan, fragmentan y se miden los valores  $m/z$  de los productos generados. El **analizador de trampa iónica**, constituido por tres electrodos que delimitan una cavidad con un campo eléctrico donde los iones generados pueden concentrarse y luego ser liberados hacia el detector en función de su  $m/z$ . Finalmente, la medida de las masas en un detector iones da lugar a un **espectro de masas** que refleja la abundancia de los iones frente a su valor  $m/z$  [226, 241].

Una particularidad de la espectrometría de masas es la posibilidad de combinación entre las fuentes de ionización y los analizadores de masas, siendo las más utilizadas el MALDI-TOF y la ionización ESI con triple cuadrupolo, con trampa iónica o con un híbrido de cuadrupolo tiempo de vuelo (Q-TOF). También han sido desarrolladas otras combinaciones como MALDI Q-TOF o dos analizadores TOF en tándem (MALDI-TOF-TOF)[241]. Como variante a la técnica de MALDI aparece el sistema de **SELDI-TOF** en el que las muestras no son sometidas a una digestión enzimática y se adsorben sobre distintas superficies en función de su carga, hidrofobicidad, etc. La ionización por MALDI provoca que solo los péptidos y proteínas de bajo peso molecular vuelen y sean detectados por el sistema TOF. Mediante un software específico se pueden determinar patrones de iones (péptidos) específicos de un grupo de casos respecto al grupo de controles. Se ha empleado en la búsqueda de biomarcadores en todo tipo de enfermedades, como por ejemplo en cáncer [242]. La principal crítica a esta técnica es que, en su formulación inicial, en esa búsqueda de patrones diferenciadores de enfermedad no se identificaban las proteínas que correspondían a los perfiles de iones. Para ello, se necesita un trabajo adicional de fragmentación, que con los espectrómetros de masas que se utilizaban para SELDI-TOF, no era posible realizarlo.

Una aplicación de gran interés de la espectrometría de masas por MALDI es la obtención de perfiles proteicos de tejidos de manera que sobre un corte histológico de un tejido es posible determinar la distribución espacial y la expresión relativa de las proteínas de dicho tejido [243]. Es más, a partir del análisis por MALDI de sucesivos cortes histológicos de un determinado tejido, la combinación de los espectros resultantes permite generar una imagen 2D de la distribución de las diferentes moléculas en el tejido e incluso revelar información acerca de su estructura [244].

### **3.2.1 Identificación de proteínas por Huella Peptídica (PMF)**

También se denomina **mapeo peptídico** y es la herramienta empleada para la identificación de proteínas a gran escala cuya secuencia está recogida en las bases de datos; generalmente el tipo de espectrómetro empleado es del tipo MALDI-TOF. La PMF de una determinada proteína es el conjunto de péptidos generados mediante la digestión de la misma con una proteasa específica, normalmente con tripsina que provoca una rotura específica entre los aa lisina y arginina siempre que prolina no aparezca entre ellos. La identificación de una proteína desconocida se alcanza comparando las masas de los péptidos obtenidos tras la digestión con las masas peptídicas teóricas de proteínas presentes en bases de datos necesitándose un gran número de péptidos coincidentes y cubrir parte de la secuencia de la proteína para que el resultado pueda ser estadísticamente positivo.

Presenta las ventajas de ser un método de análisis rápido y que tanto dicho análisis como la búsqueda en las bases de datos puede automatizarse pero por el contrario presenta los inconvenientes de necesitar que la secuencia proteica esté presente en las bases de datos, no es muy eficaz en grandes bases de datos de ADN sin anotar o sin traducir, resulta poco útil para analizar muestras con mezcla de proteínas (por ejemplo, bandas de un gel SDS-PAGE) y la presencia de modificaciones postraduccionales dificulta la identificación con la proteína no modificada registrada en las bases de datos[226].

### **3.2.2 Identificación de proteínas mediante fragmentación de péptidos**

En este sistema la identificación se consigue obteniendo la secuencia total o parcial de los aa (**secuencia peptídica**) de la proteína desconocida, generalmente empleando un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS) como por ejemplo ESI-MS/MS. Resulta de gran utilidad para identificar proteínas no anotadas en bases de datos o bien aquellas identificadas por huella peptídica que resultan ambiguas.

El proceso de forma sencilla consiste en que en el primer espectrómetro se produce la ionización de los péptidos que según su ratio m/z pueden ser clasificados y seleccionados para pasar al segundo espectrofotómetro donde en la cámara de colisión los péptidos seleccionados se fragmentan al colisionar con un gas inerte y a su vez son resueltos en función de su m/z; la fragmentación de un péptido específico

en péptidos más pequeños genera un espectro de fragmentación MS/MS que informa sobre la identidad y posición de los aa del péptido permitiendo determinar la secuencia de aa. Dependiendo de la fragmentación se podrá obtener la secuencia completa del péptido o bien la secuencia parcial. A partir de la secuencia de aa parcial, masa del péptido y la localización exacta de los aa es posible la identificación de la proteína por comparación con las anotaciones de las bases de datos (lo que se conoce como etiqueta de secuencia)[226].

Este sistema presenta mayor especificidad en la identificación que la realizada por huella peptídica y además es mucho más resolutive con mezclas de proteínas pero presenta los inconvenientes de mayor dificultad en la automatización del proceso y la rigidez de los programas informáticos para la búsqueda de etiquetas de secuencia.

En ciertos casos, si de un determinado organismo se desconoce su secuencia de ADN o las bases de datos son incompletas, para la identificación de proteínas desconocidas es necesario recurrir a la **secuenciación peptídica de novo**. El objetivo es obtener múltiples secuencias de los péptidos de una proteína mediante MS/MS y realizar búsqueda de homologías frente a proteínas presentes en bases de datos. Aunque la proteína de interés no pueda ser identificada por este sistema, la información de la secuencia proteica puede ser utilizada para clonar el gen correspondiente [241].

#### **4. Métodos empleados en Proteómica de expresión diferencial**

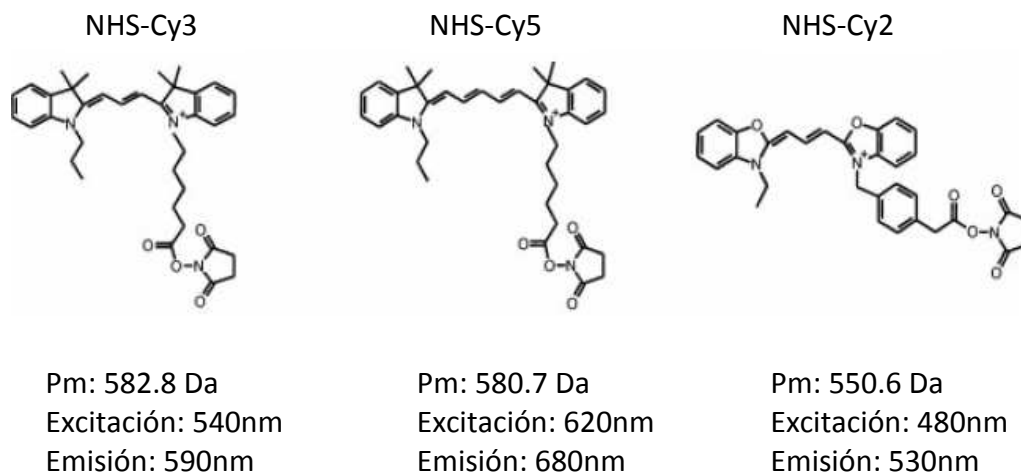
En estudios de proteómica cuantitativa se pueden comparar la expresión de proteínas de varias muestras de células, de tejido, etc., para detectar variaciones en el nivel de expresión de cada una de las proteínas de las diferentes condiciones y realizar su posterior identificación. Existen dos aproximaciones en proteómica cuantitativa según sea **basada en gel**, mediante la tecnología 2D-DIGE, o **no basada en gel** mediante distintos tipos de marcaje SILAC, iTRAQ, etc.

##### **4.1 2-D DIGE**

La metodología del 2-D DIGE es una versión mejorada de la técnica del 2-DE que soluciona algunos problemas de esta última como la variabilidad gel a gel entre réplicas experimentales y una limitada aplicación para experimentos de cuantificación. En 1997, Unlu y col. [245] desarrollaron esta metodología que combina la posibilidad

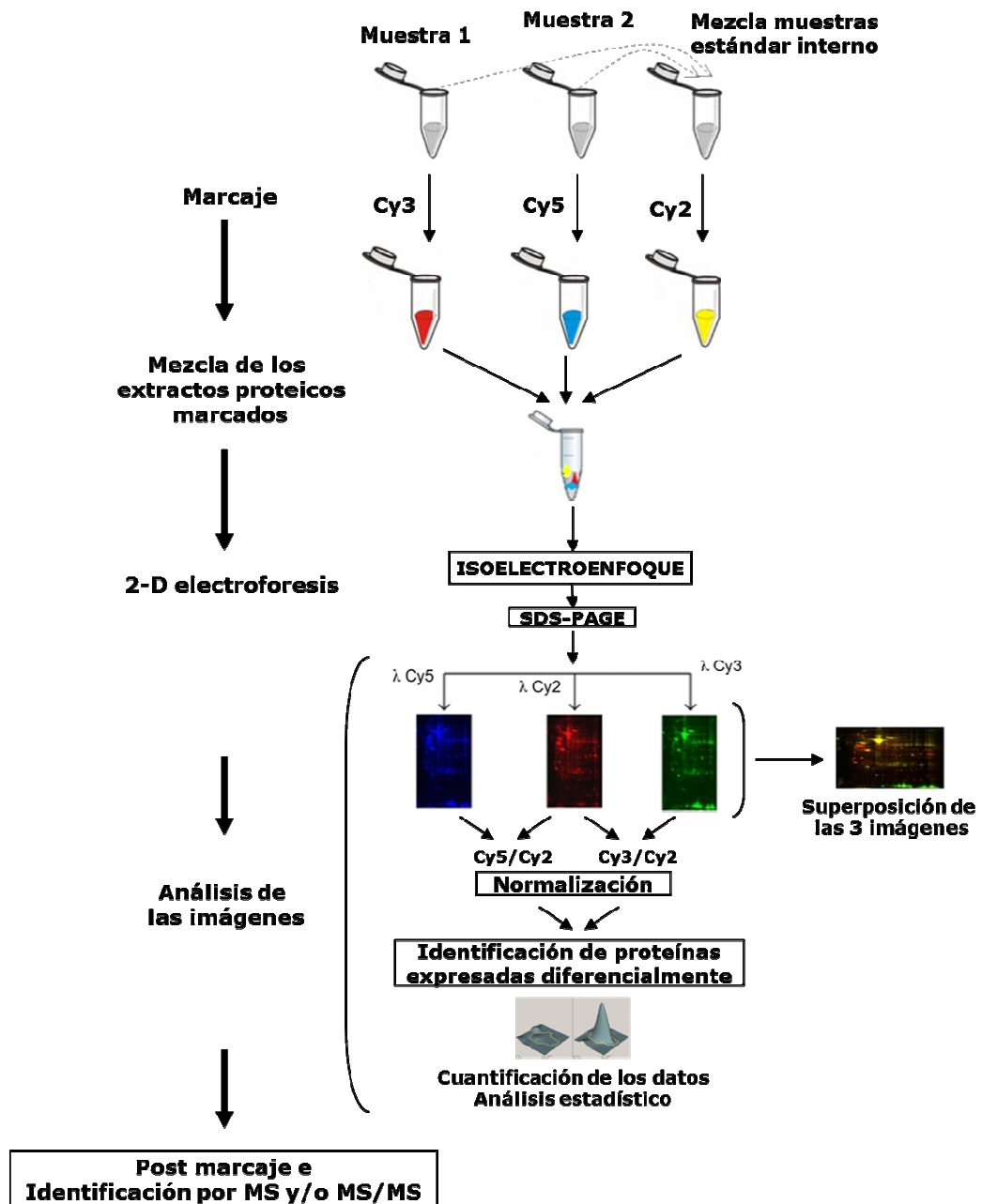
del marcaje de proteínas con sondas fluorescentes de mayor sensibilidad que los métodos de detección tradicionales, con la electroforesis 2-DE que permite una buena separación de muestras complejas de proteínas para su posterior análisis. La técnica de 2-D DIGE presenta un rango dinámico lineal de cuatro o cinco órdenes de magnitud en comparación con los uno o dos de los métodos colorimétricos como el azul de Coomassie o la tinción con plata [246]. Los fluoróforos empleados en el marcaje permiten además su detección mediante longitudes de onda distintas por lo que muestras marcadas con distintas sondas pueden ser combinadas para su separación electroforética en un mismo gel y posterior análisis. Estas moléculas fluorescentes presentan el mismo tamaño y carga para interferir de forma no significativa en la movilidad electroforética de las proteínas marcadas, independientemente del marcaje que se emplee.

La técnica de 2-D DIGE se basa en el marcaje de las proteínas de la muestra con N-hidroxysuccinimidil éster (NHS), moléculas fluorescentes derivadas de las cianinas Cy3, Cy5 y Cy2, que reaccionan de forma específica con grupos amino primarios (grupos N-terminal  $\alpha$ -amino y lisina  $\epsilon$ -amino) de las proteínas mediante una reacción de sustitución nucleofílica (**Figura6**). Inicialmente no empleado, la incorporación del fluoróforo Cy2 [247] permite la aplicación de un estándar interno consistente en una mezcla en igual cantidad de todas las muestras presentes en el ensayo y resulta de gran utilidad como control de carga, para reducir la variabilidad y permitir de forma más correcta la correlación de las proteínas separadas entre distintos geles actuar lo que en conjunto permite establecer análisis cuantitativos más precisos.



**Figura 6. Fluoróforos empleados en el marcaje para 2D-DIGE [248]**

La incorporación de este estándar interno y la alternancia en el marcaje de las muestras de un experimento con los fluoróforos Cy3 y Cy5, por ejemplo entre muestras de controles sanos y pacientes de una enfermedad; permiten la combinación de los tres componentes en un mismo gel ya que cada uno puede ser escaneado de forma independiente y combinarse en una misma imagen, reduciendo la variabilidad gel a gel, potenciando la sensibilidad y reduciendo la laboriosidad experimental con la finalidad de establecer diferencias de expresión cuantitativas y estadísticamente significativas entre dos grupos de muestras [247]. El método anteriormente descrito de los tres fluoróforos corresponde con el sistema de **marcaje mínimo** ya que únicamente en torno al tres por ciento del total de cada proteína resulta marcado por lo que de forma habitual tras la electroforesis y digitalización de los geles se realiza una tinción posterior de los mismos con métodos visibles o fluorescentes para visualizar de forma más clara la resolución del total de proteínas del gel. Esto resulta también de gran utilidad para seleccionar del gel las proteínas expresadas diferencialmente y su posterior identificación mediante MS o MS/MS o bien hacerlo de un gel preparativo en paralelo únicamente para este fin. En la **Figura 7** aparece simplificado el proceso experimental para un ensayo de 2D-DIGE (adaptado de Monteoliva y col. [249]).



**Figura 7.** Representación esquemática de los procesos de un experimento 2D-DIGE

El sistema del marcaje con los tres fluoróforos se ha aplicado en muy diversos campos de investigación desde su desarrollo y continúa siendo utilizado en la actualidad. En investigaciones sobre cáncer el número de publicaciones que emplean esta técnica es muy numeroso, sobre todo en la búsqueda de proteínas que puedan servir como biomarcadores predictivos o con valor diagnóstico de la patología [250-252], también en otros ámbitos como señalización celular [253], en neurociencia [254], en toxicología, por ejemplo sobre organismos acuáticos [255], en microbiología [256],

en plantas [257, 258], en estudios sobre organismos modelo como por ejemplo *E.coli* [259] y pez cebra [260] y en autoinmunidad, en enfermedades humanas como AR [261], esclerosis múltiple [262] o síndrome de Sjogren [263] y en modelos animales como uveítis o EAE [264-266].

Además de este sistema de marcaje mínimo, existe el sistema de **marcaje saturado** en el cual sólo se emplean los fluoróforos Cy3 y Cy5 y, en este caso, los fluoróforos derivan de maleimida cianina y marcan completamente los residuos de cisteína presentes en las proteínas de la muestra. Esta característica elimina la necesidad de la post tinción tras la electroforesis o la necesidad del gel preparativo. Se utiliza normalmente cuando la cantidad de muestra disponible es relativamente pequeña.

#### **4.2 Proteómica cuantitativa no basada en gel**

Los grandes avances instrumentales en cuanto a la resolución y sensibilidad de los instrumentos de espectrometría de masas han permitido el desarrollo de estas técnicas para estudios proteómicos cuantitativos que pueden clasificarse a su vez como **basados en marcaje o libres de marcaje**. En el primer caso, estos métodos se basan en el marcaje diferencial de dos extractos proteicos a comparar con distintos isótopos estables ( $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ ,  $^1\text{H}/^2\text{H}$ ,  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ) de manera que tras la digestión de la muestra para la obtención de los péptidos, separación de los mismos por cromatografía y posterior análisis por MS/MS; la comparación entre las dos muestras es posible ya que un mismo péptido con diferente marcaje presenta diferencias en el perfil obtenido en el espectrómetro de masas y las intensidades de cada péptido pueden utilizarse para la cuantificación relativa de los mismos. El marcaje con la molécula isotópica puede realizarse mediante **marcaje metabólico**, como el marcaje con isótopos estables de aa en cultivo celular (SILAC) y marcaje con isótopos estables de aa en mamíferos (SILAM); **marcaje químico**, como el marcaje isotópico con etiquetas de afinidad (ICAT), el marcaje isotópico con proteínas marcadas (ICPL) y el marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ); y el **marcaje enzimático**, como la incorporación de  $^{18}\text{O}$  durante la digestión triptica [267]. Los sistemas **libres de marcaje** se basan en el análisis directo de los perfiles de los cromatogramas de los péptidos junto con el análisis de la intensidad de los iones generados por espectrometría de masas para cuantificar las proteínas de la muestra [268, 269]. Los sistemas libres de marcaje y otros sistemas como los experimentos de monitorización de reacciones múltiples (MRM) [270] y el empleo de péptidos sintéticos

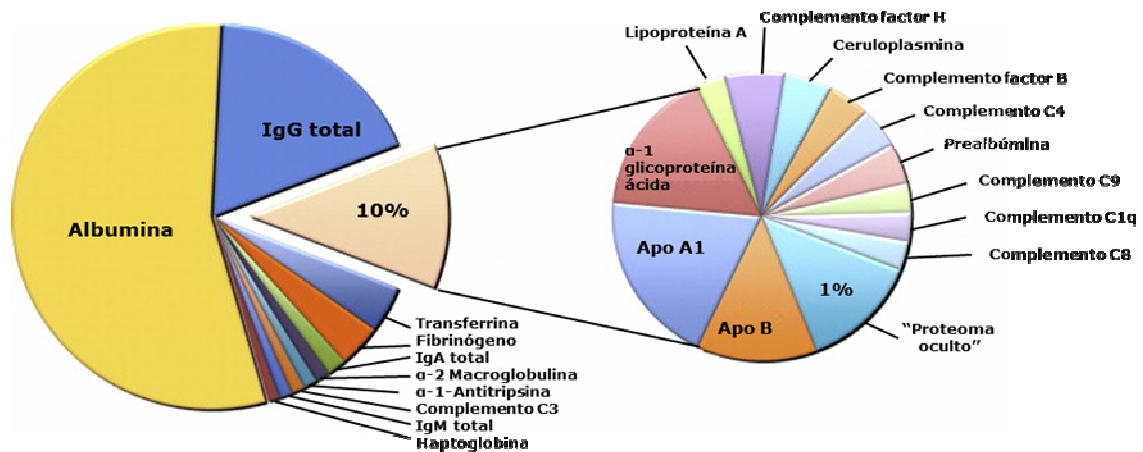
como estándares [271] son métodos que permiten realizar análisis proteómicos de cuantificación absoluta.

## 5. Fraccionamiento del suero para análisis proteómico

El plasma consiste en la fracción líquida de la sangre siendo el **suero** esta misma fracción una vez se produce la coagulación por lo que suele estar libre del fibrinógeno y otros factores implicados en la coagulación además de las células sanguíneas que pueden ser eliminadas mediante centrifugación. Se trata de una muestra biológica muy compleja compuesta por una gran diversidad de proteínas, electrolitos, productos de desecho, gases disueltos y agua entre otros componentes. Las proteínas séricas pueden proceder por secreción o liberación de distintos tejidos y células e incluso proteínas intracelulares pueden ser liberadas durante procesos de necrosis y apoptosis [272, 273].

El suero o el plasma constituyen una importante fuente de información acerca del estado fisiológico de un organismo por registrar cambios en los patrones de expresión de proteínas séricas que pueden ser indicativos de distintos estímulos o determinadas situaciones patológicas. Estas características junto con la facilidad para su obtención como muestra biológica hacen que el suero también sea empleado para la búsqueda de biomarcadores proteicos indicativos de una cierta patología o enfermedad. Aparecen ejemplos en muy diversos ámbitos como pueden ser: enfermedades autoinmunes como AR [274, 275], esclerosis múltiple [276] o LES [277], en varios tipos de cáncer como cáncer de próstata [278] o de colon [279], enfermedades infecciosas como la tuberculosis [280], etc. Sin embargo, la utilidad del suero como herramienta diagnóstica o fuente de información fisiológica se ve limitada por la baja concentración de estas moléculas en el suero y por el gran rango dinámico de concentraciones que el suero presenta. El rango de concentraciones de proteínas séricas es de más de diez órdenes de magnitud lo que ya de por sí limita la posibilidad del estudio del Proteoma sérico mediante las técnicas de 2-DE o LC-MS/MS. La albúmina sérica representa entre el 50 y 70% del total de proteína del suero y junto con otras 10 proteínas muy abundantes como IgG, Haptoglobinas,  $\alpha$ -1-antitripsina, etc. constituyen en torno al 90% del total de proteínas del suero (**ver Figura 8**).



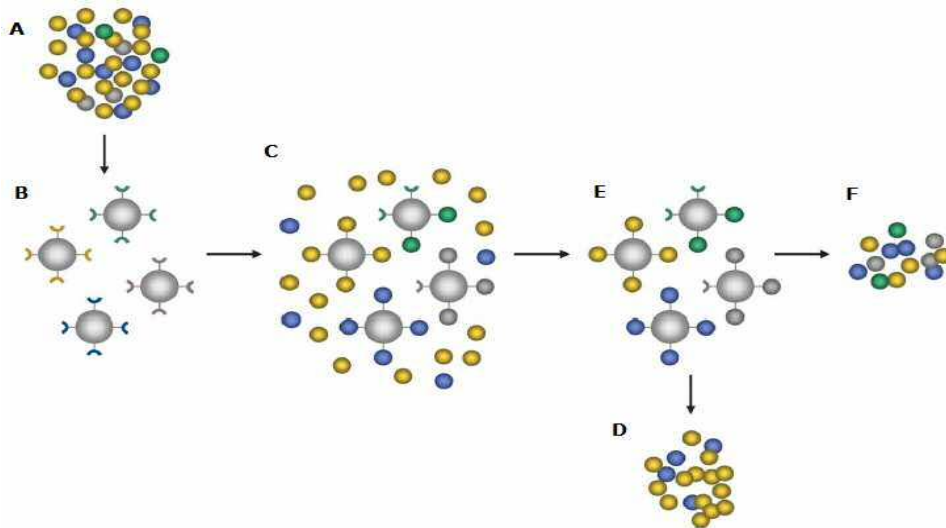


**Figura 8.** Representación de la concentración relativa de las proteínas más abundantes en el suero/plasma. Adaptado de Lista y col. [281]

Debido a este amplio rango de concentraciones, para poder detectar proteínas que puedan servir como biomarcadores o con una implicación funcional importante que estén a baja o muy baja concentración es necesario realizar un fraccionamiento del suero previo al análisis proteómico. Los sistemas para eliminar estas proteínas muy abundantes en el suero se basan en técnicas de separación, detección y marcaje que además pueden ser combinadas entre sí. Distintas estrategias para eliminar estas proteínas en alta concentración de la muestra son comparadas en distintas publicaciones como en el trabajo de Whiteaker y col. [282] donde se compara el fraccionamiento por tamaño y los sistemas relacionados con unión a ligandos específicos como por ejemplo enriquecimiento en cisteinil péptidos, separación por bolitas magnéticas, o depleción mediante proteína A/G; y el trabajo de Luque-García y col. [283] donde se comparan diversos sistemas como electroforesis en gel y capilar, cromatografía líquida y extracción en fase sólida o solventes orgánicos entre otros. Entre todos los sistemas, la **depleción** de albúmina y las inmunoglobulinas es la más empleada existiendo múltiples opciones de sistemas en columna que permiten deplecionar las proteínas más abundantes de forma combinada [284]. Sin embargo, la eficacia de la depleción no suele ser total, se produce una dilución de la muestra a veces de hasta cien veces que requiere un paso posterior de concentración de la muestra y además puede causar la pérdida de proteínas de interés ya que, por ejemplo, la albúmina actúa en sangre como proteína transportadora y su eliminación del suero puede llevar asociada la eliminación de otras proteínas con relevancia fisiológica [285].

Como método alternativo y novedoso a la depleción aparece el empleo de las **librerías de hexapéptidos**. Ya en 1991 Lam y col. proponen el empleo de librerías de hexapéptidos como método para separar proteínas de muestras complejas [286] aunque el primer trabajo sobre su aplicación en el campo de la proteómica como técnica de fraccionamiento del suero aparece en 2005 [287] y hasta nuestros días su uso ha sido extendido sobre muestras de muy diversa índole y naturaleza como plasma [288], orina [289], plaquetas humanas [290], eritrocitos [291] o plantas [292, 293]. Algunos trabajos como el de Sihlbom y col. [294] comparan el empleo de las librerías de hexapéptidos y el fraccionamiento por depleción demostrando las bondades de las librerías de hexapéptidos como técnica muy robusta y reproducible para la detección de proteínas de concentración muy baja que de otra manera permanecen indetectables.

En este sistema no se trata tanto de eliminar las proteínas mayoritarias sino de realizar una “ecualización” de la muestra al variar el rango dinámico del proteoma de la muestra aumentando la presencia de las proteínas minoritarias respecto del total (**ver Figura 9**). La muestra compleja (**A**) compuesta por diferentes proteínas a distinta concentración (esferas de distintos colores) es puesta en contacto con la librería de hexapéptidos (**B**) consistente en una colección muy numerosa de bolitas que llevan acopladas una serie de hexapéptidos con capacidad de unir un único tipo de proteína por bolita. Cuando se incuba la librería con la muestra (**C**) las proteínas mayoritarias saturan rápidamente sus ligandos y el exceso puede ser eliminado por lavado (**D**) (proteínas azules y amarillas) de la librería mientras que las proteínas minoritarias se unen prácticamente en su totalidad con sus ligandos sin llegar a saturarse (**E**). Una vez se separan las proteínas de la librería (**F**), en la muestra resultante aparecen representadas las mismas proteínas que en la muestra inicial antes del fraccionamiento pero las proporciones son muy diferentes permitiéndose la detección de muchas más especies proteicas que anteriormente estaban enmascaradas por la presencia de proteínas en muy alta concentración.



**Figura 9.** Representación del proceso de “ecualización” para variar el rango de concentraciones de una muestra compleja mediante el empleo de las librerías de hexapéptidos [295]

Este sistema, comercializado por *Biorad* con el nombre de *Proteominer*, consiste en el empaquetamiento en columnas de las bolitas con los hexapéptidos y aun estando optimizado para muestras de suero y plasma su empleo se va diversificando tal y como fue referido anteriormente. Al contrario de lo que sucede con la depleción, donde la capacidad de unión de los anticuerpos limita el volumen de muestra aplicable, las columnas de *Proteominer* permiten el empleo de volúmenes superiores incluso a 1 ml permitiendo así una mayor recuperación de proteínas con baja concentración en la muestra. Además, tras este proceso de fraccionamiento la muestra es recogida en un volumen muy reducido lo que facilita el procesamiento posterior sin necesidad de concentrar la muestra. Recientemente algunos trabajos como el de Fröbely col. [296] demuestran la alta sensibilidad y reproducibilidad del uso de *Proteominer* acoplado a espectrometría de masas SELDI-TOF como método para explotar el “Proteoma oculto” y encontrar proteínas con potencial función como biomarcador.

## 6. Otras técnicas empleadas en Proteómica

Además de las tipos antes mencionados aparecen otra serie de técnicas que resultan de gran utilidad en el estudio de las proteínas. Usadas ya de forma tradicional aparecen las técnicas de **Western Blot** y **ELISA** (ensayo por inmunoabsorción ligado

a enzimas) que además son las que suelen utilizarse para la validación de forma independiente de los posibles biomarcadores encontrados en estudios proteómicos cuantitativos. Los grandes avances técnicos en el campo de la proteómica han permitido además el desarrollo de nuevas tecnologías con grandes perspectivas de futuro. Podemos mencionar los **arrays de proteínas** que permiten de forma masiva, en paralelo y de forma simultánea el estudio de interacciones proteína-proteína (interactoma) y establecer perfiles de expresión diferencial de proteínas. Las proteínas de interés de un proteoma pueden ser expresadas masivamente, purificadas, depositadas e inmovilizadas de manera individual, ordenada e independiente sobre un soporte sólido[297]. Asociados al desarrollo de los *arrays* resultan de gran importancia el desarrollo de los sistemas de detección para conseguir sistema con mayor sensibilidad y resolución [298]. Comentado de forma resumida, la mayoría de las aplicaciones han empleado **técnicas de detección basadas en etiquetas** como por ejemplo, la utilización de radioisótopos ( $^{32}\text{P}$ ) o de fluorocromos (fluoresceína, BODIPY, cianinas, etc.) [298]. Más novedoso resulta el empleo de otros sistemas de detección como los basados en esferas, asociados a la citometría de flujo [299] o la detección mediante esferas magnéticas acopladas a anticuerpos para detectar las proteínas diana [300]; o desarrollos nanotecnológicos asociados a la proteómica, como los llamados *quantum dots* [301] o las nanopartículas magnéticas [302]. Otros métodos de detección son los **denominados libres de etiquetas o marcaje** aplicados a los arrays como pueden ser la resonancia de plasmón de superficie (SPR) [303], los microcantilevers [304] o la microscopía de fuerza atómica [305].



#### IV. REFERENCIAS

1. Rabilloud, T., et al., *Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial*. J Proteomics, **2011**. 74(10): p. 1829-41.
2. Deaglio, S., et al., *CD38 at the junction between prognostic marker and therapeutic target*. Trends Mol Med, **2008**. 14(5): p. 210-8.
3. Reinherz, EL., et al., *Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1980**. 77(3): p. 1588-92.
4. Santos-Argumedo, L., et al., *A B lymphocyte surface molecule mediating activation and protection from apoptosis via calcium channels*. J Immunol, **1993**. 151(6): p. 3119-30.
5. Funaro, A., et al., *Schematic portrait of human CD38 and related molecules*. Chem Immunol, **2000**. 75: p. 256-73.
6. Malavasi, F., et al., *Human CD38: a glycoprotein in search of a function*. Immunol Today, **1994**. 15(3): p. 95-7.
7. Khoo, KM., et al., *Characterization and localization of CD38 in the vertebrate eye*. Brain Res, **1999**. 821(1): p. 17-25.
8. Koguma, T., et al., *Cloning and characterization of cDNA encoding rat ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase (homologue to human CD38) from islets of Langerhans*. Biochim Biophys Acta, **1994**. 1223(1): p. 160-2.
9. Mizuguchi, M., et al., *Neuronal localization of CD38 antigen in the human brain*. Brain Res, **1995**. 697(1-2): p. 235-40.
10. Moreno-Garcia, ME., et al., *CD38 is expressed as noncovalently associated homodimers on the surface of murine B lymphocytes*. Eur J Biochem, **2004**. 271(5): p. 1025-34.
11. Munoz, P., et al., *Antigen-induced clustering of surface CD38 and recruitment of intracellular CD38 to the immunologic synapse*. Blood, **2008**. 111(7): p. 3653-64.
12. Khoo, KM., et al., *Identification and characterization of nuclear CD38 in the rat spleen*. Int J Biochem Cell Biol, **2002**. 34(1): p. 43-54.
13. Adebajo, OA., et al., *A new function for CD38/ADP-ribosyl cyclase in nuclear Ca<sup>2+</sup> homeostasis*. Nat Cell Biol, **1999**. 1(7): p. 409-14.
14. Yalcintepe, L., et al., *Nuclear CD38 in retinoic acid-induced HL-60 cells*. Exp Cell Res, **2005**. 303(1): p. 14-21.
15. Zhao, YJ., et al., *The membrane-bound enzyme CD38 exists in two opposing orientations*. Sci Signal, **2012**. 5(241): p. ra67.
16. Funaro, A., et al., *Identification and characterization of an active soluble form of human CD38 in normal and pathological fluids*. Int Immunol, **1996**. 8(11): p. 1643-50.
17. Zumaquero, E., et al., *Exosomes from human lymphoblastoid B cells express enzymatically active CD38 that is associated with signaling complexes containing CD81, Hsc-70 and Lyn*. Exp Cell Res, **2010**. 316(16): p. 2692-706.
18. Mittelbrunn, M., et al., *Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells*. Nat Commun, **2011**. 2: p. 282.
19. Howard, M., et al., *Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38*. Science, **1993**. 262(5136): p. 1056-9.
20. Lund, FE., et al., *CD38 signaling in B lymphocytes is controlled by its ectodomain but occurs independently of enzymatically generated ADP-ribose or cyclic ADP-ribose*. J Immunol, **1999**. 162(5): p. 2693-702.
21. Deaglio, S., et al., *CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells*. Blood, **2003**. 102(6): p. 2146-55.
22. Coetzee, LM., et al., *From research tool to routine test: CD38 monitoring in HIV patients*. Cytometry B Clin Cytom, **2009**. 76(6): p. 375-84.
23. Giorgi, JV., et al., *Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage*. J Infect Dis, **1999**. 179(4): p. 859-70.
24. Mallone, R., et al., *Autoantibody response to CD38 in Caucasian patients with type 1 and type 2 diabetes: immunological and genetic characterization*. Diabetes, **2001**. 50(4): p. 752-62.
25. Drach, J., et al., *Retinoic acid-induced expression of CD38 antigen in myeloid cells is mediated through retinoic acid receptor- $\alpha$* . Cancer Res, **1994**. 54(7): p. 1746-52.

26. Pavon, E.J., et al., *Increased CD38 expression in T cells and circulating anti-CD38 IgG autoantibodies differentially correlate with distinct cytokine profiles and disease activity in systemic lupus erythematosus patients*. *Cytokine*, **2013**. 62(2): p. 232-43.
27. Schuber, F., et al., *Structure and enzymology of ADP-ribosyl cyclases: conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites*. *Curr Mol Med*, **2004**. 4(3): p. 249-61.
28. Hellmich, M.R., et al., *Purification and characterization of a molluscan egg-specific NADase, a second-messenger enzyme*. *Cell Regul*, **1991**. 2(3): p. 193-202.
29. Goodrich, S.P., et al., *Production of calcium-mobilizing metabolites by a novel member of the ADP-ribosyl cyclase family expressed in Schistosoma mansoni*. *Biochemistry*, **2005**. 44(33): p. 11082-97.
30. Jackson, D.G., et al., *Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation*. *J Immunol*, **1990**. 144(7): p. 2811-5.
31. Harada, N., et al., *Expression cloning of a cDNA encoding a novel murine B cell activation marker. Homology to human CD38*. *J Immunol*, **1993**. 151(6): p. 3111-8.
32. Ferrero, E., et al., *The human CD38 gene: polymorphism, CpG island, and linkage to the CD157 (BST-1) gene*. *Immunogenetics*, **1999**. 49(7-8): p. 597-604.
33. Ferrero, E., et al., *Human CD38, a leukocyte receptor and ectoenzyme, is a member of a novel eukaryotic gene family of nicotinamide adenine dinucleotide+-converting enzymes: extensive structural homology with the genes for murine bone marrow stromal cell antigen 1 and aplysian ADP-ribosyl cyclase*. *J Immunol*, **1997**. 159(8): p. 3858-65.
34. Kishimoto, H., et al., *Molecular mechanism of human CD38 gene expression by retinoic acid. Identification of retinoic acid response element in the first intron*. *J Biol Chem*, **1998**. 273(25): p. 15429-34.
35. Song, E.K., et al., *NAADP mediates insulin-stimulated glucose uptake and insulin sensitization by PPARgamma in adipocytes*. *Cell Rep*, **2012**. 2(6): p. 1607-19.
36. Saborit-Villarroya, I., et al., *E2A is a transcriptional regulator of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia*. *Leukemia*, **2011**. 25(3): p. 479-88.
37. Gonzalez-Escribano, M.F., et al., *CD38 polymorphisms in Spanish patients with systemic lupus erythematosus*. *Hum Immunol*, **2004**. 65(6): p. 660-4.
38. Ortolan, E., et al., *CD157, the Janus of CD38 but with a unique personality*. *Cell Biochem Funct*, **2002**. 20(4): p. 309-22.
39. Liu, Q., et al., *Crystal structure of human CD38 extracellular domain*. *Structure*, **2005**. 13(9): p. 1331-9.
40. Munshi, C., et al., *Identification of the enzymatic active site of CD38 by site-directed mutagenesis*. *J Biol Chem*, **2000**. 275(28): p. 21566-71.
41. Graeff, R., et al., *A single residue at the active site of CD38 determines its NAD cyclizing and hydrolyzing activities*. *J Biol Chem*, **2001**. 276(15): p. 12169-73.
42. Zubiaur, M., et al., *CD38 is associated with lipid rafts and upon receptor stimulation leads to Akt/protein kinase B and Erk activation in the absence of the CD3-zeta immune receptor tyrosine-based activation motifs*. *J Biol Chem*, **2002**. 277(1): p. 13-22.
43. States, D.J., et al., *Similarities in amino acid sequences of Aplysia ADP-ribosyl cyclase and human lymphocyte antigen CD38*. *Trends Biochem Sci*, **1992**. 17(12): p. 495.
44. Aarhus, R., et al., *ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP*. *J Biol Chem*, **1995**. 270(51): p. 30327-33.
45. Morra, M., et al., *CD38 is functionally dependent on the TCR/CD3 complex in human T cells*. *FASEB J*, **1998**. 12(7): p. 581-92.
46. Meszaros, L.G., et al., *Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> channel*. *Nature*, **1993**. 364(6432): p. 76-9.
47. Kuemmerle, J.F., et al., *Agonist-stimulated cyclic ADP ribose. Endogenous modulator of Ca<sup>(2+)</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release in intestinal longitudinal muscle*. *J Biol Chem*, **1995**. 270(43): p. 25488-94.
48. Takasawa, S., et al., *Cyclic ADP-ribose in insulin secretion from pancreatic beta cells*. *Science*, **1993**. 259(5093): p. 370-3.
49. Zocchi, E., et al., *A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD<sup>+</sup> glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, **1993**. 196(3): p. 1459-65.
50. Kato, I., et al., *CD38 disruption impairs glucose-induced increases in cyclic ADP-ribose, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, and insulin secretion*. *J Biol Chem*, **1999**. 274(4): p. 1869-72.

51. Fukushi, Y., et al., *Identification of cyclic ADP-ribose-dependent mechanisms in pancreatic muscarinic Ca(2+) signaling using CD38 knockout mice.* J Biol Chem, **2001**. 276(1): p. 649-55.
52. Partida-Sanchez, S., et al., *Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo.* Nat Med, **2001**. 7(11): p. 1209-16.
53. Langhorst, MF., et al., *Ca<sup>2+</sup> release via ryanodine receptors and Ca<sup>2+</sup> entry: major mechanisms in NAADP-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in T-lymphocytes.* Cell Signal, **2004**. 16(11): p. 1283-9.
54. Lee, HC. *Physiological functions of cyclic ADP-ribose and NAADP as calcium messengers.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, **2001**. 41: p. 317-45.
55. Guse, AH., et al., *Ca<sup>2+</sup> entry induced by cyclic ADP-ribose in intact T-lymphocytes.* J Biol Chem, **1997**. 272(13): p. 8546-50.
56. Perraud, AL., et al., *ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology.* Nature, **2001**. 411(6837): p. 595-9.
57. Sano, Y., et al., *Immunocyte Ca<sup>2+</sup> influx system mediated by LTRPC2.* Science, **2001**. 293(5533): p. 1327-30.
58. Santella, L. *NAADP: a new second messenger comes of age.* Mol Interv, **2005**. 5(2): p. 70-2.
59. Lee, HC. *Structure and enzymatic functions of human CD38.* Mol Med, **2006**. 12(11-12): p. 317-23.
60. Gerasimenko, JV., et al., *NAADP mobilizes Ca<sup>2+</sup> from a thapsigargin-sensitive store in the nuclear envelope by activating ryanodine receptors.* J Cell Biol, **2003**. 163(2): p. 271-82.
61. Menteyne, A., et al., *Generation of specific Ca(2+) signals from Ca(2+) stores and endocytosis by differential coupling to messengers.* Curr Biol, **2006**. 16(19): p. 1931-7.
62. Kolisek, M., et al., *Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels.* Mol Cell, **2005**. 18(1): p. 61-9.
63. Beck, A., et al., *Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and cyclic ADP-ribose regulate TRPM2 channels in T lymphocytes.* FASEB J, **2006**. 20(7): p. 962-4.
64. Han, MK., et al., *Interaction of two classes of ADP-ribose transfer reactions in immune signaling.* J Biol Chem, **2000**. 275(27): p. 20799-805.
65. Seman, M., et al., *NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor.* Immunity, **2003**. 19(4): p. 571-82.
66. Krebs, C., et al., *CD38 controls ADP-ribosyltransferase-2-catalyzed ADP-ribosylation of T cell surface proteins.* J Immunol, **2005**. 174(6): p. 3298-305.
67. Bruzzone, S., et al., *Extracellular NAD<sup>+</sup> regulates intracellular calcium levels and induces activation of human granulocytes.* Biochem J, **2006**. 393(Pt 3): p. 697-704.
68. Moreschi, I., et al., *Extracellular NAD<sup>+</sup> is an agonist of the human P2Y11 purinergic receptor in human granulocytes.* J Biol Chem, **2006**. 281(42): p. 31419-29.
69. Partida-Sanchez, S., et al., *Chemotaxis and calcium responses of phagocytes to formyl peptide receptor ligands is differentially regulated by cyclic ADP ribose.* J Immunol, **2004**. 172(3): p. 1896-906.
70. Partida-Sanchez, S., et al., *Chemotaxis of mouse bone marrow neutrophils and dendritic cells is controlled by adp-ribose, the major product generated by the CD38 enzyme reaction.* J Immunol, **2007**. 179(11): p. 7827-39.
71. Franco, L., et al., *The transmembrane glycoprotein CD38 is a catalytically active transporter responsible for generation and influx of the second messenger cyclic ADP-ribose across membranes.* FASEB J, **1998**. 12(14): p. 1507-20.
72. Pastor-Anglada, M., et al., *Complex regulation of nucleoside transporter expression in epithelial and immune system cells.* Mol Membr Biol, **2001**. 18(1): p. 81-5.
73. Franco, L., et al., *Paracrine roles of NAD<sup>+</sup> and cyclic ADP-ribose in increasing intracellular calcium and enhancing cell proliferation of 3T3 fibroblasts.* J Biol Chem, **2001**. 276(24): p. 21642-8.
74. Aksoy, P., et al., *Regulation of intracellular levels of NAD: a novel role for CD38.* Biochem Biophys Res Commun, **2006**. 345(4): p. 1386-92.
75. Barbosa, MT., et al., *The enzyme CD38 (a NAD glycohydrolase, EC 3.2.2.5) is necessary for the development of diet-induced obesity.* FASEB J, **2007**. 21(13): p. 3629-39.
76. Aksoy, P., et al., *Regulation of SIRT 1 mediated NAD dependent deacetylation: a novel role for the multifunctional enzyme CD38.* Biochem Biophys Res Commun, **2006**. 349(1): p. 353-9.



77. Funaro, A., et al., *Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation*. J Immunol, **1990**. 145(8): p. 2390-6.
78. Malavasi, F., et al., *CD38: a multi-lineage cell activation molecule with a split personality*. Int J Clin Lab Res, **1992**. 22(2): p. 73-80.
79. Deaglio, S., et al., *Human CD38 ligand. A 120-KDA protein predominantly expressed on endothelial cells*. J Immunol, **1996**. 156(2): p. 727-34.
80. Deaglio, S., et al., *Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member*. J Immunol, **1998**. 160(1): p. 395-402.
81. Dianzani, U., et al., *Interaction between endothelium and CD4+CD45RA+ lymphocytes. Role of the human CD38 molecule*. J Immunol, **1994**. 153(3): p. 952-9.
82. Deaglio, S., et al., *CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes*. Chem Immunol, **2000**. 75: p. 99-120.
83. Nishina, H., et al., *Cell surface antigen CD38 identified as ecto-enzyme of NAD glycohydrolase has hyaluronate-binding activity*. Biochem Biophys Res Commun, **1994**. 203(2): p. 1318-23.
84. Cockayne, DA., et al., *Mice deficient for the ecto-nicotinamide adenine dinucleotide glycohydrolase CD38 exhibit altered humoral immune responses*. Blood, **1998**. 92(4): p. 1324-33.
85. Wykes, MN., et al., *Dendritic cells and follicular dendritic cells express a novel ligand for CD38 which influences their maturation and antibody responses*. Immunology, **2004**. 113(3): p. 318-27.
86. Liu, XQ., et al., *Soluble CD38 significantly prolongs the lifespan of memory B-cell responses*. Immunology, **2008**. 125(1): p. 14-20.
87. Zubiaur, M., et al., *CD38 ligation results in activation of the Raf-1/mitogen-activated protein kinase and the CD3-zeta/zeta-associated protein-70 signaling pathways in Jurkat T lymphocytes*. J Immunol, **1997**. 159(1): p. 193-205.
88. Munoz, P., et al., *CD38 signaling in T cells is initiated within a subset of membrane rafts containing Lck and the CD3-zeta subunit of the T cell antigen receptor*. J Biol Chem, **2003**. 278(50): p. 50791-802.
89. Cho, YS., et al., *Direct interaction of the CD38 cytoplasmic tail and the Lck SH2 domain. Cd38 transduces T cell activation signals through associated Lck*. J Biol Chem, **2000**. 275(3): p. 1685-90.
90. Kitanaka, A., et al., *CD38-mediated signaling events in murine pro-B cells expressing human CD38 with or without its cytoplasmic domain*. J Immunol, **1999**. 162(4): p. 1952-8.
91. Funaro, A., et al., *Human CD38 is associated to distinct molecules which mediate transmembrane signaling in different lineages*. Eur J Immunol, **1993**. 23(10): p. 2407-11.
92. Deaglio, S., et al., *CD38/CD19: a lipid raft-dependent signaling complex in human B cells*. Blood, **2007**. 109(12): p. 5390-8.
93. Lund, FE., et al., *Signaling through CD38 augments B cell antigen receptor (BCR) responses and is dependent on BCR expression*. J Immunol, **1996**. 157(4): p. 1455-67.
94. Tuveson, DA., et al., *CD19 of B cells as a surrogate kinase insert region to bind phosphatidylinositol 3-kinase*. Science, **1993**. 260(5110): p. 986-9.
95. van Noesel, CJ., et al., *The CR2/CD19 complex on human B cells contains the src-family kinase Lyn*. Int Immunol, **1993**. 5(7): p. 699-705.
96. Vences-Catalan, F., et al., *The CD19/CD81 complex physically interacts with CD38 but is not required to induce proliferation in mouse B lymphocytes*. Immunology, **2012**. 137(1): p. 48-55.
97. Zilber, MT., et al., *MHC class II/CD38/CD9: a lipid-raft-dependent signaling complex in human monocytes*. Blood, **2005**. 106(9): p. 3074-81.
98. Lande, R., et al., *CD38 ligation plays a direct role in the induction of IL-1beta, IL-6, and IL-10 secretion in resting human monocytes*. Cell Immunol, **2002**. 220(1): p. 30-8.
99. Fedele, G., et al., *CD38 is expressed on human mature monocyte-derived dendritic cells and is functionally involved in CD83 expression and IL-12 induction*. Eur J Immunol, **2004**. 34(5): p. 1342-50.
100. Frasca, L., et al., *CD38 orchestrates migration, survival, and Th1 immune response of human mature dendritic cells*. Blood, **2006**. 107(6): p. 2392-9.
101. Partida-Sanchez, S., et al., *Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity*. Immunity, **2004**. 20(3): p. 279-91.

102. Deaglio, S., et al., *Human CD38 and CD16 are functionally dependent and physically associated in natural killer cells*. *Blood*, **2002**. 99(7): p. 2490-8.
103. Mallone, R., et al., *Signaling through CD38 induces NK cell activation*. *Int Immunol*, **2001**. 13(4): p. 397-409.
104. Young, GS., et al., *Decreased cADPR and increased NAD<sup>+</sup> in the Cd38<sup>-/-</sup> mouse*. *Biochem Biophys Res Commun*, **2006**. 346(1): p. 188-92.
105. Shi, G., et al., *Identification of an alternative G $\alpha$ q-dependent chemokine receptor signal transduction pathway in dendritic cells and granulocytes*. *J Exp Med*, **2007**. 204(11): p. 2705-18.
106. Randolph, GJ., et al., *Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances*. *Springer Semin Immunopathol*, **2005**. 26(3): p. 273-87.
107. Forster, R., et al., *CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs*. *Cell*, **1999**. 99(1): p. 23-33.
108. Gunn, MD., et al., *Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization*. *J Exp Med*, **1999**. 189(3): p. 451-60.
109. Kato, I., et al., *Regulatory role of CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase) in insulin secretion by glucose in pancreatic beta cells. Enhanced insulin secretion in CD38-expressing transgenic mice*. *J Biol Chem*, **1995**. 270(50): p. 30045-50.
110. Johnson, JD., et al., *Suppressed insulin signaling and increased apoptosis in CD38-null islets*. *Diabetes*, **2006**. 55(10): p. 2737-46.
111. Chen, J., et al., *Targeted disruption of CD38 accelerates autoimmune diabetes in NOD/Lt mice by enhancing autoimmunity in an ADP-ribosyltransferase 2-dependent fashion*. *J Immunol*, **2006**. 176(8): p. 4590-9.
112. Koch-Nolte, F., et al., *ADP-ribosylation of membrane proteins: unveiling the secrets of a crucial regulatory mechanism in mammalian cells*. *Ann Med*, **2006**. 38(3): p. 188-99.
113. Aswad, F., et al., *High sensitivity of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors*. *J Immunol*, **2005**. 175(5): p. 3075-83.
114. Scheuplein, F., et al., *A recombinant heavy chain antibody approach blocks ART2 mediated deletion of an iNKT cell population that upon activation inhibits autoimmune diabetes*. *J Autoimmun*, **2010**. 34(2): p. 145-54.
115. Seman, M., et al., *Ecto-ADP-ribosyltransferases (ARTs): emerging actors in cell communication and signaling*. *Curr Med Chem*, **2004**. 11(7): p. 857-72.
116. Lopatina, O., et al., *The roles of oxytocin and CD38 in social or parental behaviors*. *Front Neurosci*, **2012**. 6: p. 182.
117. Jin, D., et al., *CD38 is critical for social behaviour by regulating oxytocin secretion*. *Nature*, **2007**. 446(7131): p. 41-5.
118. Liu, HX., et al., *Locomotor activity, ultrasonic vocalization and oxytocin levels in infant CD38 knockout mice*. *Neurosci Lett*, **2008**. 448(1): p. 67-70.
119. Touma, C., et al., *Mice selected for high versus low stress reactivity: a new animal model for affective disorders*. *Psychoneuroendocrinology*, **2008**. 33(6): p. 839-62.
120. Munesue, T., et al., *Two genetic variants of CD38 in subjects with autism spectrum disorder and controls*. *Neurosci Res*, **2010**. 67(2): p. 181-91.
121. Scattoni, ML., et al., *Reduced ultrasonic vocalizations in vasopressin 1b knockout mice*. *Behav Brain Res*, **2008**. 187(2): p. 371-8.
122. Hollander, E., et al., *Oxytocin infusion reduces repetitive behaviors in adults with autistic and Asperger's disorders*. *Neuropsychopharmacology*, **2003**. 28(1): p. 193-8.
123. Macdonald, K., et al., *The peptide that binds: a systematic review of oxytocin and its prosocial effects in humans*. *Harv Rev Psychiatry*, **2010**. 18(1): p. 1-21.
124. Iqbal, J., et al., *Extracellular NAD<sup>+</sup> metabolism modulates osteoclastogenesis*. *Biochem Biophys Res Commun*, **2006**. 349(2): p. 533-9.
125. Lischke, T., et al., *CD38 Controls the Innate Immune Response against *Listeria monocytogenes**. *Infect Immun*, **2013**. 81(11): p. 4091-9.
126. Deshpande, DA., et al., *CD38/cyclic ADP-ribose signaling: role in the regulation of calcium homeostasis in airway smooth muscle*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **2005**. 288(5): p. L773-88.
127. Guedes, AG., et al., *CD38-deficient mice have reduced airway hyperresponsiveness following IL-13 challenge*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **2006**. 291(6): p. L1286-93.

128. Takahashi, J., et al., *Deficit of CD38/cyclic ADP-ribose is differentially compensated in hearts by gender*. *Biochem Biophys Res Commun*, **2003**. 312(2): p. 434-40.
129. Mitsui-Saito, M., et al., *CD38 gene disruption inhibits the contraction induced by alpha-adrenoceptor stimulation in mouse aorta*. *J Vet Med Sci*, **2003**. 65(12): p. 1325-30.
130. Carroll, M. *Innate immunity in the etiopathology of autoimmunity*. *Nat Immunol*, **2001**. 2(12): p. 1089-90.
131. Sospedra, M., et al., *When T cells recognize a pattern, they might cause trouble*. *Curr Opin Immunol*, **2006**. 18(6): p. 697-703.
132. Chatenoud, L. *Immune therapies of autoimmune diseases: are we approaching a real cure?* *Curr Opin Immunol*, **2006**. 18(6): p. 710-7.
133. Firestein, GS. *Evolving concepts of rheumatoid arthritis*. *Nature*, **2003**. 423(6937): p. 356-61.
134. McInnes, IB., et al., *The pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *N Engl J Med*, **2011**. 365(23): p. 2205-19.
135. Scott, DL., et al., *Rheumatoid arthritis*. *Lancet*, **2010**. 376(9746): p. 1094-108.
136. Gregersen, PK., et al., *The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, **1987**. 30(11): p. 1205-13.
137. De Almeida, DE., et al., *Immune dysregulation by the rheumatoid arthritis shared epitope*. *J Immunol*, **2010**. 185(3): p. 1927-34.
138. Weyand, CM., et al., *Disease-associated human histocompatibility leukocyte antigen determinants in patients with seropositive rheumatoid arthritis. Functional role in antigen-specific and allogeneic T cell recognition*. *J Clin Invest*, **1990**. 85(4): p. 1051-7.
139. Goronzy, JJ., et al., *Developments in the scientific understanding of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res Ther*, **2009**. 11(5): p. 249.
140. Nakano, K., et al., *DNA methylome signature in rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, **2013**. 72(1): p. 110-7.
141. MacGregor, AJ., et al., *Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins*. *Arthritis Rheum*, **2000**. 43(1): p. 30-7.
142. Kamphuis, S., et al., *Tolerogenic immune responses to novel T-cell epitopes from heat-shock protein 60 in juvenile idiopathic arthritis*. *Lancet*, **2005**. 366(9479): p. 50-6.
143. Lundberg, K., et al., *Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection*. *Nat Rev Rheumatol*, **2010**. 6(12): p. 727-30.
144. Lee, YK., et al., *Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system?* *Science*, **2010**. 330(6012): p. 1768-73.
145. Klareskog, L., et al., *Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis*. *Annu Rev Immunol*, **2008**. 26: p. 651-75.
146. Hart, JE., et al., *Exposure to traffic pollution and increased risk of rheumatoid arthritis*. *Environ Health Perspect*, **2009**. 117(7): p. 1065-9.
147. Hu, Y., et al., *Advances in research on animal models of rheumatoid arthritis*. *Clin Rheumatol*, **2013**. 32(2): p. 161-5.
148. Vincent, TL., et al., *Mapping pathogenesis of arthritis through small animal models*. *Rheumatology (Oxford)*, **2012**. 51(11): p. 1931-41.
149. Asquith, DL., et al., *Animal models of rheumatoid arthritis*. *Eur J Immunol*, **2009**. 39(8): p. 2040-4.
150. Trentham, DE., et al., *Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis*. *J Exp Med*, **1977**. 146(3): p. 857-68.
151. Courtenay, JS., et al., *Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice*. *Nature*, **1980**. 283(5748): p. 666-8.
152. Cathcart, ES., et al., *Experimental arthritis in a nonhuman primate. I. Induction by bovine type II collagen*. *Lab Invest*, **1986**. 54(1): p. 26-31.
153. Inglis, JJ., et al., *Collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is associated with a robust and sustained T-cell response to type II collagen*. *Arthritis Res Ther*, **2007**. 9(5): p. R113.
154. Wooley, PH., et al., *Type II collagen-induced arthritis in mice. IV. Variations in immunogenetic regulation provide evidence for multiple arthritogenic epitopes on the collagen molecule*. *J Immunol*, **1985**. 135(4): p. 2443-51.
155. Wooley, PH., et al., *Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates*. *J Exp Med*, **1981**. 154(3): p. 688-700.

156. Pan, M., et al., *Resistance to development of collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is due to a defect in secondary, but not in primary, immune response*. J Clin Immunol, **2004**. 24(5): p. 481-91.
157. Postigo, J., et al., *Mice deficient in CD38 develop an attenuated form of collagen type II-induced arthritis*. PLoS One, **2012**. 7(3): p. e33534.
158. Schurgers, E., et al., *Collagen-induced arthritis as an animal model for rheumatoid arthritis: focus on interferon-gamma*. J Interferon Cytokine Res, **2011**. 31(12): p. 917-26.
159. Schurgers, E., et al., *Pulmonary inflammation in mice with collagen-induced arthritis is conditioned by complete Freund's adjuvant and regulated by endogenous IFN-gamma*. Eur J Immunol, **2012**. 42(12): p. 3223-34.
160. Stuart, JM., et al., *Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice*. J Exp Med, **1983**. 158(2): p. 378-92.
161. Terato, K., et al., *Collagen-induced arthritis in mice. Localization of an arthritogenic determinant to a fragment of the type II collagen molecule*. J Exp Med, **1985**. 162(2): p. 637-46.
162. Holmdahl, R., et al., *Characterization of the antibody response in mice with type II collagen-induced arthritis, using monoclonal anti-type II collagen antibodies*. Arthritis Rheum, **1986**. 29(3): p. 400-10.
163. Koobkokkrud, T., et al., *Efficient induction of arthritis in mice by an arthritogenic 4-clone cocktail of anti-type II collagen monoclonal antibodies recognizing different epitopes of the antigen*. Biol Pharm Bull, **2013**. 36(8): p. 1299-304.
164. Santos, LL., et al., *Anti-neutrophil monoclonal antibody therapy inhibits the development of adjuvant arthritis*. Clin Exp Immunol, **1997**. 107(2): p. 248-53.
165. Nandakumar, KS., et al., *Collagen type II (CII)-specific antibodies induce arthritis in the absence of T or B cells but the arthritis progression is enhanced by CII-reactive T cells*. Arthritis Res Ther, **2004**. 6(6): p. R544-50.
166. Brackertz, D., et al., *Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice*. Arthritis Rheum, **1977**. 20(3): p. 841-50.
167. Keystone, EC., et al., *Zymosan-induced arthritis: a model of chronic proliferative arthritis following activation of the alternative pathway of complement*. Arthritis Rheum, **1977**. 20(7): p. 1396-401.
168. Wooley, PH., et al., *Pristane-induced arthritis. The immunologic and genetic features of an experimental murine model of autoimmune disease*. Arthritis Rheum, **1989**. 32(8): p. 1022-30.
169. Henningsson, L., et al., *Interleukin-17A during local and systemic Staphylococcus aureus-induced arthritis in mice*. Infect Immun, **2010**. 78(9): p. 3783-90.
170. Sakiniene, E., et al., *Combined antibiotic and free radical trap treatment is effective at combating Staphylococcus-aureus-induced septic arthritis*. Arthritis Res, **2002**. 4(3): p. 196-200.
171. Ma, Y., et al., *Distinct characteristics of resistance to Borrelia burgdorferi-induced arthritis in C57BL/6N mice*. Infect Immun, **1998**. 66(1): p. 161-8.
172. Keffer, J., et al., *Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis*. EMBO J, **1991**. 10(13): p. 4025-31.
173. Korganow, AS., et al., *From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins*. Immunity, **1999**. 10(4): p. 451-61.
174. Sakaguchi, N., et al., *Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice*. Nature, **2003**. 426(6965): p. 454-60.
175. Geiler, T., et al., *A new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal human cartilage into SCID mice*. Arthritis Rheum, **1994**. 37(11): p. 1664-71.
176. Koenders, ML., et al., *Interleukin-1 drives pathogenic Th17 cells during spontaneous arthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice*. Arthritis Rheum, **2008**. 58(11): p. 3461-70.
177. Sawa, S., et al., *Autoimmune arthritis associated with mutated interleukin (IL)-6 receptor gp130 is driven by STAT3/IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD4+ T cells*. J Exp Med, **2006**. 203(6): p. 1459-70.
178. Eming, R., et al., *Humanized mice as a model for rheumatoid arthritis*. Arthritis Res, **2002**. 4 Suppl 3: p. S133-40.
179. Kawane, K., et al., *Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages*. Nature, **2006**. 443(7114): p. 998-1002.
180. Cho, YG., et al., *Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis*. Autoimmun Rev, **2007**. 7(1): p. 65-70.

181. Osman, GE., et al., *Characterization of the T cell receptor repertoire causing collagen arthritis in mice*. J Exp Med, **1993**. 177(2): p. 387-95.
182. Holmdahl, R., et al., *T lymphocytes in collagen II-induced arthritis in mice. Characterization of arthritogenic collagen II-specific T-cell lines and clones*. Scand J Immunol, **1985**. 22(3): p. 295-306.
183. Ehinger, M., et al., *Influence of CD4 or CD8 deficiency on collagen-induced arthritis*. Immunology, **2001**. 103(3): p. 291-300.
184. Murakami, M., et al., *Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells*. J Exp Med, **2011**. 208(1): p. 103-14.
185. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell, **2008**. 133(5): p. 775-87.
186. Morgan, ME., et al., *Effective treatment of collagen-induced arthritis by adoptive transfer of CD25+ regulatory T cells*. Arthritis Rheum, **2005**. 52(7): p. 2212-21.
187. Morgan, ME., et al., *CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis*. Arthritis Rheum, **2003**. 48(5): p. 1452-60.
188. Nguyen, LT., et al., *Where FoxP3-dependent regulatory T cells impinge on the development of inflammatory arthritis*. Arthritis Rheum, **2007**. 56(2): p. 509-20.
189. Monte, K., et al., *Increased number and function of FoxP3 regulatory T cells during experimental arthritis*. Arthritis Rheum, **2008**. 58(12): p. 3730-41.
190. Wehrens, EJ., et al., *Functional human regulatory T cells fail to control autoimmune inflammation due to PKB/c-akt hyperactivation in effector cells*. Blood, **2011**. 118(13): p. 3538-48.
191. Flores-Borja, F., et al., *Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2008**. 105(49): p. 19396-401.
192. Manoury-Schwartz, B., et al., *High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors*. J Immunol, **1997**. 158(11): p. 5501-6.
193. Vermeire, K., et al., *Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice*. J Immunol, **1997**. 158(11): p. 5507-13.
194. Murphy, CA., et al., *Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation*. J Exp Med, **2003**. 198(12): p. 1951-7.
195. Peck, A., et al., *Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis*. Clin Immunol, **2009**. 132(3): p. 295-304.
196. Chabaud, M., et al., *Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium*. Arthritis Rheum, **1999**. 42(5): p. 963-70.
197. Simon, AK., et al., *Divergent T-cell cytokine patterns in inflammatory arthritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1994**. 91(18): p. 8562-6.
198. Furuzawa-Carballeda, J., et al., *Autoimmune inflammation from the Th17 perspective*. Autoimmun Rev, **2007**. 6(3): p. 169-75.
199. Geboes, L., et al., *Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice*. Arthritis Rheum, **2009**. 60(2): p. 390-5.
200. Lubberts, E., et al., *Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion*. Arthritis Rheum, **2004**. 50(2): p. 650-9.
201. Svensson, L., et al., *B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA)*. Clin Exp Immunol, **1998**. 111(3): p. 521-6.
202. Edwards, JC., et al., *Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, **2004**. 350(25): p. 2572-81.
203. Fleming, SD., et al., *Complement, natural antibodies, autoantibodies and tissue injury*. Autoimmun Rev, **2006**. 5(2): p. 89-92.
204. Wang, Y., et al., *A role for complement in antibody-mediated inflammation: C5-deficient DBA/1 mice are resistant to collagen-induced arthritis*. J Immunol, **2000**. 164(8): p. 4340-7.
205. Tanaka, D., et al., *Essential role of neutrophils in anti-type II collagen antibody and lipopolysaccharide-induced arthritis*. Immunology, **2006**. 119(2): p. 195-202.
206. Abdollahi-Roodsaz, S., et al., *Inhibition of Toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in autoimmune destructive arthritis*. Arthritis Rheum, **2007**. 56(9): p. 2957-67.
207. Douni, E., et al., *Transgenic and knockout analyses of the role of TNF in immune regulation and disease pathogenesis*. J Inflamm, **1995**. 47(1-2): p. 27-38.
208. Matmati, M., et al., *A20 (TNFAIP3) deficiency in myeloid cells triggers erosive polyarthritis resembling rheumatoid arthritis*. Nat Genet, **2011**. 43(9): p. 908-12.

209. Takayanagi, H. *Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone*. Nat Rev Rheumatol, **2009**. 5(12): p. 667-76.
210. Bugatti, S., et al., *B cells in rheumatoid arthritis*. Autoimmun Rev, **2007**. 7(2): p. 137-42.
211. Theill, LE., et al., *RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution*. Annu Rev Immunol, **2002**. 20: p. 795-823.
212. Pettit, AR., et al., *TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis*. Am J Pathol, **2001**. 159(5): p. 1689-99.
213. Dore, RK., et al., *Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in patients with rheumatoid arthritis receiving concurrent glucocorticoids or bisphosphonates*. Ann Rheum Dis, **2010**. 69(5): p. 872-5.
214. Kotake, S., et al., *IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis*. J Clin Invest, **1999**. 103(9): p. 1345-52.
215. Kim, YG., et al., *Human CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit the differentiation of osteoclasts from peripheral blood mononuclear cells*. Biochem Biophys Res Commun, **2007**. 357(4): p. 1046-52.
216. Zaiss, MM., et al., *Treg cells suppress osteoclast formation: a new link between the immune system and bone*. Arthritis Rheum, **2007**. 56(12): p. 4104-12.
217. Komatsu, N., et al., *Autoimmune arthritis: the interface between the immune system and joints*. Adv Immunol, **2012**. 115: p. 45-71.
218. Wilkins, MR., et al., *Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it*. Biotechnol Genet Eng Rev, **1996**. 13: p. 19-50.
219. Ahlf, DR., et al., *Developing top down proteomics to maximize proteome and sequence coverage from cells and tissues*. Curr Opin Chem Biol, **2013**. 17(5): p. 787-94.
220. Gonzalez-Buitrago, JM., et al., *[Clinical proteomics and new biomarkers in biological fluids]*. Med Clin (Barc), **2008**. 131(11): p. 426-34. Proteomica clinica y nuevos biomarcadores en los líquidos biológicos.
221. O'Farrell, PH. *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem, **1975**. 250(10): p. 4007-21.
222. Laemmli, UK. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, **1970**. 227(5259): p. 680-5.
223. Gronow, M., et al., *Rapid isolation and separation of the non-histone proteins of rat liver nuclei*. FEBS Lett, **1971**. 15(5): p. 340-4.
224. Gorg, A., et al., *Ultrathin-layer isoelectric focusing in polyacrylamide gels on cellophane*. Anal Biochem, **1978**. 89(1): p. 60-70.
225. Gorg, A., et al., *Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics*. Proteomics, **2004**. 4(12): p. 3665-85.
226. Simpson, RJ. *Proteins and proteomics : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003. xiii, 926 p. p.
227. Chevalier, F., et al., *Different impact of staining procedures using visible stains and fluorescent dyes for large-scale investigation of proteomes by MALDI-TOF mass spectrometry*. J Proteome Res, **2006**. 5(3): p. 512-20.
228. Hecker, M., et al., *Gel-based proteomics of Gram-positive bacteria: a powerful tool to address physiological questions*. Proteomics, **2008**. 8(23-24): p. 4958-75.
229. Pitarch, A., et al., *Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus Candida albicans cell wall proteome*. Mol Cell Proteomics, **2002**. 1(12): p. 967-82.
230. Afjehi-Sadat, L., et al., *Identification of enzymes and activity from two-dimensional gel electrophoresis*. Nat Protoc, **2007**. 2(10): p. 2318-24.
231. Sanchez-Campillo, M., et al., *Identification of immunoreactive proteins of Chlamydia trachomatis by Western blot analysis of a two-dimensional electrophoresis map with patient sera*. Electrophoresis, **1999**. 20(11): p. 2269-79.
232. Chen, G., et al., *Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2003**. 100(23): p. 13537-42.
233. Antonucci, F., et al., *Two-dimensional molecular profiling of mantle cell lymphoma*. Electrophoresis, **2003**. 24(14): p. 2376-85.
234. Ahram, M., et al., *Proteomic analysis of human prostate cancer*. Mol Carcinog, **2002**. 33(1): p. 9-15.
235. Ishigami, A., et al., *Abnormal accumulation of citrullinated proteins catalyzed by peptidylarginine deiminase in hippocampal extracts from patients with Alzheimer's disease*. J Neurosci Res, **2005**. 80(1): p. 120-8.

236. Santoni, V., et al., *Membrane proteins and proteomics: un amour impossible?* Electrophoresis, **2000**. 21(6): p. 1054-70.
237. Petrak, J., et al., *Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins.* Proteomics, **2008**. 8(9): p. 1744-9.
238. Edman, P. *A method for the determination of amino acid sequence in peptides.* Arch Biochem, **1949**. 22(3): p. 475.
239. Calvete, JJ., et al., *Snake venomomics. Strategy and applications.* J Mass Spectrom, **2007**. 42(11): p. 1405-14.
240. Paul, D., et al., *Mass spectrometry-based proteomics in molecular diagnostics: discovery of cancer biomarkers using tissue culture.* Biomed Res Int, **2013**. 2013: p. 783131.
241. Graves, PR., et al., *Molecular biologist's guide to proteomics.* Microbiol Mol Biol Rev, **2002**. 66(1): p. 39-63; table of contents.
242. Tang, N., et al., *Current developments in SELDI affinity technology.* Mass Spectrom Rev, **2004**. 23(1): p. 34-44.
243. Chaurand, P., et al., *Direct profiling of proteins in biological tissue sections by MALDI mass spectrometry.* Anal Chem, **1999**. 71(23): p. 5263-70.
244. Caldwell, RL., et al., *Tissue profiling by mass spectrometry: a review of methodology and applications.* Mol Cell Proteomics, **2005**. 4(4): p. 394-401.
245. Unlu, M., et al., *Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts.* Electrophoresis, **1997**. 18(11): p. 2071-7.
246. Tonge, R., et al., *Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology.* Proteomics, **2001**. 1(3): p. 377-96.
247. Alban, A., et al., *A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard.* Proteomics, **2003**. 3(1): p. 36-44.
248. Timms, JF., et al., *Difference gel electrophoresis.* Proteomics, **2008**. 8(23-24): p. 4886-97.
249. Monteoliva, L., et al., *Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches.* Brief Funct Genomic Proteomic, **2004**. 3(3): p. 220-39.
250. Alfonso, P., et al., *Proteomic expression analysis of colorectal cancer by two-dimensional differential gel electrophoresis.* Proteomics, **2005**. 5(10): p. 2602-11.
251. Ferrin, G., et al., *Identification of candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma in plasma of HCV-infected cirrhotic patients by 2-D DIGE.* Liver Int, **2013**. p.
252. Lokamani, I., et al., *Gelsolin and Ceruloplasmin as Potential Predictive Biomarkers for Cervical Cancer by 2D-DIGE Proteomics Analysis.* Pathol Oncol Res, **2013**. p.
253. Sitek, B., et al., *Identification of dynamic proteome changes upon ligand activation of Trk-receptors using two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis and mass spectrometry.* Mol Cell Proteomics, **2005**. 4(3): p. 291-9.
254. Focking, M., et al., *2-D DIGE as a quantitative tool for investigating the HUPO Brain Proteome Project mouse series.* Proteomics, **2006**. 6(18): p. 4914-31.
255. Martyniuk, CJ., et al., *DIGE and iTRAQ as biomarker discovery tools in aquatic toxicology.* Ecotoxicol Environ Saf, **2012**. 76(2): p. 3-10.
256. Zhou, H., et al., *Differential proteomic profiles from distinct Toxoplasma gondii strains revealed by 2D-difference gel electrophoresis.* Exp Parasitol, **2013**. 133(4): p. 376-82.
257. Amme, S., et al., *Proteome analysis of cold stress response in Arabidopsis thaliana using DIGE-technology.* J Exp Bot, **2006**. 57(7): p. 1537-46.
258. Di Carli, M., et al., *Two-dimensional differential in gel electrophoresis (2D-DIGE) analysis of grape berry proteome during postharvest withering.* J Proteome Res, **2011**. 10(2): p. 429-46.
259. Yan, JX., et al., *Fluorescence two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry based proteomic analysis of Escherichia coli.* Proteomics, **2002**. 2(12): p. 1682-98.
260. Lucitt, MB., et al., *Analysis of the zebrafish proteome during embryonic development.* Mol Cell Proteomics, **2008**. 7(5): p. 981-94.
261. Kamada, T., et al., *Proteomic analysis of bone marrow-adherent cells in rheumatoid arthritis and osteoarthritis.* Int J Rheum Dis, **2012**. 15(2): p. 169-78.
262. Liu, S., et al., *Quantitative proteomic analysis of the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis.* J Cell Mol Med, **2009**. 13(8A): p. 1586-603.
263. Ryu, OH., et al., *Identification of parotid salivary biomarkers in Sjogren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis.* Rheumatology (Oxford), **2006**. 45(9): p. 1077-86.

264. Nakaya, M., et al., *GRK6 deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance*. Nat Commun, **2013**. 4: p. 1532.
265. Saraswathy, S., et al., *Posttranslational modification of differentially expressed mitochondrial proteins in the retina during early experimental autoimmune uveitis*. Mol Vis, **2011**. 17: p. 1814-21.
266. Vanheel, A., et al., *Identification of protein networks involved in the disease course of experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis*. PLoS One, **2012**. 7(4): p. e35544.
267. Yates, JR., et al., *Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications*. Annu Rev Biomed Eng, **2009**. 11: p. 49-79.
268. Beynon, RJ., et al., *Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides*. Nat Methods, **2005**. 2(8): p. 587-9.
269. Megger, DA., et al., *Label-free quantification in clinical proteomics*. Biochim Biophys Acta, **2013**. 1834(8): p. 1581-90.
270. Lange, V., et al., *Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial*. Mol Syst Biol, **2008**. 4: p. 222.
271. Gerber, SA., et al., *Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2003**. 100(12): p. 6940-5.
272. Hu, S., et al., *Human body fluid proteome analysis*. Proteomics, **2006**. 6(23): p. 6326-53.
273. Linder, S., et al., *Determining tumor apoptosis and necrosis in patient serum using cytokeratin 18 as a biomarker*. Cancer Lett, **2004**. 214(1): p. 1-9.
274. Liao, H., et al., *Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, **2004**. 50(12): p. 3792-803.
275. Ortea, I., et al., *Discovery of serum proteomic biomarkers for prediction of response to infliximab (a monoclonal anti-TNF antibody) treatment in rheumatoid arthritis: an exploratory analysis*. J Proteomics, **2012**. 77: p. 372-82.
276. Sawai, S., et al., *Serum levels of complement C4 fragments correlate with disease activity in multiple sclerosis: proteomic analysis*. J Neuroimmunol, **2010**. 218(1-2): p. 112-5.
277. Bauer, JW., et al., *Elevated serum levels of interferon-regulated chemokines are biomarkers for active human systemic lupus erythematosus*. PLoS Med, **2006**. 3(12): p. e491.
278. Pang, J., et al., *Profiling protein markers associated with lymph node metastasis in prostate cancer by DIGE-based proteomics analysis*. J Proteome Res, **2010**. 9(1): p. 216-26.
279. Xue, H., et al., *Identification of serum biomarkers for colorectal cancer metastasis using a differential secretome approach*. J Proteome Res, **2010**. 9(1): p. 545-55.
280. Agranoff, D., et al., *Identification of diagnostic markers for tuberculosis by proteomic fingerprinting of serum*. Lancet, **2006**. 368(9540): p. 1012-21.
281. Lista, S., et al., *Biological and methodical challenges of blood-based proteomics in the field of neurological research*. Prog Neurobiol, **2013**. 101-102: p. 18-34.
282. Whiteaker, JR., et al., *Head-to-head comparison of serum fractionation techniques*. J Proteome Res, **2007**. 6(2): p. 828-36.
283. Luque-Garcia, JL., et al., *Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry*. J Chromatogr A, **2007**. 1153(1-2): p. 259-76.
284. Linke, T., et al., *Rat plasma proteomics: effects of abundant protein depletion on proteomic analysis*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, **2007**. 849(1-2): p. 273-81.
285. Shen, Y., et al., *Characterization of the human blood plasma proteome*. Proteomics, **2005**. 5(15): p. 4034-45.
286. Lam, KS., et al., *A new type of synthetic peptide library for identifying ligand-binding activity*. Nature, **1991**. 354(6348): p. 82-4.
287. Thulasiraman, V., et al., *Reduction of the concentration difference of proteins in biological liquids using a library of combinatorial ligands*. Electrophoresis, **2005**. 26(18): p. 3561-71.
288. D'Amici, GM., et al., *Combinatorial peptide ligand libraries to discover liver disease biomarkers in plasma samples*. Methods Mol Biol, **2012**. 909: p. 311-9.
289. Castagna, A., et al., *Exploring the hidden human urinary proteome via ligand library beads*. J Proteome Res, **2005**. 4(6): p. 1917-30.
290. Guerrier, L., et al., *Exploring the platelet proteome via combinatorial, hexapeptide ligand libraries*. J Proteome Res, **2007**. 6(11): p. 4290-303.



291. Roux-Dalvai, F., et al., *Extensive analysis of the cytoplasmic proteome of human erythrocytes using the peptide ligand library technology and advanced mass spectrometry*. Mol Cell Proteomics, **2008**. 7(11): p. 2254-69.
292. Fasoli, E., et al., *The peel and pulp of mango fruit: A proteomic samba*. Biochim Biophys Acta, **2013**. 1834(12): p. 2539-45.
293. Frohlich, A., et al., *Looking deep inside: detection of low-abundance proteins in leaf extracts of Arabidopsis and phloem exudates of pumpkin*. Plant Physiol, **2012**. 159(3): p. 902-14.
294. Sihlbom, C., et al., *Evaluation of the combination of bead technology with SELDI-TOF-MS and 2-D DIGE for detection of plasma proteins*. J Proteome Res, **2008**. 7(9): p. 4191-8.
295. Guerrier, L., et al., *Reduction of dynamic protein concentration range of biological extracts for the discovery of low-abundance proteins by means of hexapeptide ligand library*. Nat Protoc, **2008**. 3(5): p. 883-90.
296. Frobel, J., et al., *ProteoMiner and SELDI-TOF-MS: a robust and highly reproducible combination for biomarker discovery from whole blood serum*. Arch Physiol Biochem, **2010**. 116(4-5): p. 174-80.
297. Hall, DA., et al., *Protein microarray technology*. Mech Ageing Dev, **2007**. 128(1): p. 161-7.
298. Espina, V., et al., *Protein microarray detection strategies: focus on direct detection technologies*. J Immunol Methods, **2004**. 290(1-2): p. 121-33.
299. Blazer, LL., et al., *Use of flow cytometric methods to quantify protein-protein interactions*. Curr Protoc Cytom, **2010**. Chapter 13: p. Unit 13 1 1-5.
300. Gantelius, J., et al., *Magnetic bead-based detection of autoimmune responses using protein microarrays*. N Biotechnol, **2009**. 26(6): p. 269-76.
301. Sun, YP., et al., *Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence*. J Am Chem Soc, **2006**. 128(24): p. 7756-7.
302. Daniel, MC., et al., *Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology*. Chem Rev, **2004**. 104(1): p. 293-346.
303. Johnsson, B., et al., *Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors*. Anal Biochem, **1991**. 198(2): p. 268-77.
304. Mukhopadhyay, R., et al., *Cantilever sensor for nanomechanical detection of specific protein conformations*. Nano Lett, **2005**. 5(12): p. 2385-8.
305. Breitenstein, M., et al., *Immobilization of different biomolecules by atomic force microscopy*. J Nanobiotechnology, **2010**. 8: p. 10.

*Objetivos*



# *Objetivos*

1. Evaluar la eficacia de reducir el rango dinámico de concentración de las proteínas séricas mediante el empleo de librerías de hexapéptidos con el objetivo primordial de detectar proteínas en baja concentración que pudieran ser relevantes en un modelo de artritis inducida en ratón.
2. Análisis mediante 2D-DIGE y espectrometría de masas de la expresión diferencial de proteínas del suero de ratones deficientes en CD38 (CD38ko) respecto a ratones silvestres con el mismo fondo genético (WT) en tres situaciones experimentales: 1) modelo de artritis inducida por colágeno, 2) modelo de inflamación crónica y 3) ratones no inmunizados.
3. Análisis estadístico multivariante de las proteínas con expresión diferencial identificadas en el objetivo anterior con el objetivo de determinar perfiles de expresión distintos con capacidad de discriminación y clasificación de los ratones en función de la patología que padecen y/o de la ausencia de CD38.
4. Identificación de los subtipos de células inmuno-competentes implicados en el desarrollo de la artritis, con especial atención en células de origen mieloide y a la influencia de CD38 en ese proceso.
5. Evaluación de la influencia de las células iNKT en relación con la ausencia de CD38 y su posible implicación sobre la generación de precursores de osteoclastos y su diferenciación hacia osteoclastos funcionalmente activos.



# *Metodología*



## E) METODOLOGÍA

### 1. Obtención del suero

Tras el sacrificio de los ratones mediante asfixia por CO<sub>2</sub> la sangre fue extraída directamente del corazón por punción, depositada en un tubo de 1.5 ml. Se incubó a temperatura ambiente durante dos horas y posteriormente toda la noche a 4 °C para dejar coagular la sangre. Al día siguiente se centrifugó 10 min. a velocidad máxima a 4 °C y el suero obtenido se dividió en alícuotas para su almacenamiento a -80 °C. La concentración de proteínas se determinó mediante el kit *RC-DC Protein Assay* (Bio-Rad).

### 2. Fraccionamiento de las muestras de suero

Las muestras de suero fueron fraccionadas empleando el *kit Proteominer Protein Enrichment* (Bio-Rad) de pequeña capacidad siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras el equilibrado de las columnas con el tampón de lavado (PBS, 150 mM NaCl, 10 mM NaH PO<sub>4</sub>, pH 7.4), 200 µl de suero de cada muestra se añadieron a las respectivas columnas del kit que contenían empaquetadas las esferas que llevaban asociadas las librerías de hexapéptidos y se incubaron con agitación orbital a temperatura ambiente durante 2h. Seguidamente, se realizaron 4 lavados con el tampón de lavado descartándose los eluidos que se recogieron tras cada lavado. Finalmente, la elución de las proteínas de las columnas se realizó en tres pasos secuenciales mediante adición de 20µl del tampón de eluido (8 M urea, 2% CHAPS, 5% ácido acético) y agitación mediante vortex durante 15min., juntando el eluido recogido tras cada uno de los tres pasos de elución. Posteriormente, las muestras se precipitaron utilizando el *kit ReadyPrep 2-D Cleanup* (Bio-Rad) y se resuspendieron en un tampón que contenía 7M Urea, 2M Tiourea, 4% (p/v) CHAPS y 20 mM Tris con pH 8.8, compatible con el marcaje con los fluoróforos del *kit CyDye DIGE* (GE Healthcare), para la posterior cuantificación mediante el kit *RC-DC Protein Assay* (Bio-Rad).

### 3. Marcaje de las proteínas del suero para análisis proteómico 2D-DIGE

Los extractos de proteínas de los sueros se marcaron con los fluoróforos *CyDyes DIGE* de marcaje mínimo (GE Healthcare) siguiendo el protocolo



recomendado por el fabricante. Para el marcaje, 50  $\mu$ g de proteína de cada muestra se marcaron con 400 pmol del fluoróforo Cy3 ó Cy5 correspondiente y se incubaron en hielo durante 30 min. en oscuridad. Una mezcla de proteínas de todas las muestras del experimento se marcaron con el fluoróforo Cy2 como estándar interno para lo cual, se utilizó la misma cantidad de extracto de cada muestra y la mezcla se incluyó en todos los geles que componían un determinado experimento. La reacción de marcaje se detuvo incubando con 1  $\mu$ l de 10 mM de lisina (Sigma-Aldrich) en hielo durante 10 min en oscuridad. Tras la reacción de marcaje las muestras fueron guardadas a -80°C hasta el momento de su empleo para la electroforesis bidimensional.

#### **4. Electroforesis bidimensional en gel**

Las muestras marcadas con los fluoróforos del DIGE se combinaron en función del diseño experimental de manera que cada gel presentaba una muestra marcada con Cy3 y otra con Cy5 junto con el estándar interno. La mezcla de muestras marcadas para cada gel se completaron hasta un volumen de 200  $\mu$ l con el tampón de solubilización y rehidratación compuesto por 8 M de urea, 2% (p/v) de CHAPS, 50 mM de DTT, 0.2% *Bio-Lyte 3/10 ampholyte*, y 0.001% de azul de bromofenol (Bio-Rad). La electroforesis bidimensional (2-DE) se llevó a cabo utilizando el sistema *Protein IEF Cell* para la primera dimensión, y el sistema *Criterion* para la segunda dimensión, ambos de Bio-Rad. Para la primera dimensión, se utilizaron tiras IPG (Bio-Rad) de 11 cm con un gradiente lineal de pH de 3-10. La rehidratación de las tiras e incorporación de la muestra a dichas tiras se realizó de forma simultánea mediante rehidratación activa a 50 V durante 16 h a 20 °C. Posteriormente, la separación de las proteínas se realizó en un único paso a 8000 V hasta un total de 40000 Vh a 20 °C con un límite de corriente de 50  $\mu$ A por tira. Antes de la separación en la segunda dimensión, las tiras se equilibraron durante 10 min en Tampón de Equilibrado I (6 M urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 20% glicerol y 2% (p/v) DTT), y posteriormente otros 10 min en Tampón de Equilibrado II (Tampón de Equilibrado I con 2.5% p/v de yodoacetamida en lugar de DTT). Las tiras IPG equilibradas se colocaron sobre geles *Criterion XT* con gradiente del 4-12% en tampón XT MES, y la separación electroforética se realizó a temperatura ambiente a 150 V. durante aproximadamente 1h.

#### **5. Digitalización de los geles y análisis de las imágenes**

Tras la electroforesis bidimensional, se llevó a cabo la digitalización de los geles mediante el escáner *Typhoon Imager 9400 (GE Healthcare)* a una resolución de

100 nm y con las longitudes de onda de excitación correspondientes para cada *CyeDye* (Cy3 (532 nm), Cy5 (633 nm), Cy2 (488 nm)). El análisis de las imágenes para el estudio de expresión diferencial se llevó a cabo mediante el *software DeCyder 7.0 (GE Healthcare)* mediante el módulo de Análisis Diferencial (DIA) para la detección y cuantificación de las manchas proteicas y el módulo de Análisis de la Variación Biológica (BVA) para la comparación simultánea de las manchas proteicas entre los distintos geles del experimento. Para el análisis multivariante se empleó el módulo extendido de análisis de datos (EDA Versión 1.0). Dentro de este módulo de análisis estadístico multivariante se empleó el análisis de componentes principales (PCA), consistente en una serie de métodos para reducir la dimensión de las variables en estudio de un espacio multidimensional, el algoritmo del PCA analiza los datos para reducir el nº de variables que definen el objeto o elemento en estudio ya que en la mayoría de las ocasiones las variables presentan correlación entre sí. La determinación de los distintos componentes principales de un conjunto de datos se realiza de forma secuencial de manera que el primer componente principal contiene la mayoría de información (la mayoría de la variabilidad del conjunto de datos) y sucesivamente el resto de componentes contienen menos información. Adicionalmente, se realizó un análisis de agrupación o clasificación jerarquizada no supervisada en dendogramas o *heat maps* que resultaron de utilidad para la clasificación de los datos al establecer correlaciones entre patrones de expresión o muestras con niveles de expresión similares de las proteínas analizadas.

Para la identificación de proteínas de interés, tras la digitalización de los geles para el análisis mediante DeCyder, los geles se fijaron durante 30 min en una solución consistente en 10% metanol y 7% ácido acético para seguidamente teñir las proteínas con el marcaje fluorescente *SYPRO Ruby* (Biorad) durante la noche de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Las proteínas de interés se seleccionaron mediante el software PDQuest (BioRad) y su escisión del gel se realizó mediante el equipo *EXquest Spot Cutter* (BioRad). Para la identificación de proteínas de interés también se realizaron geles preparativos para este fin con una concentración mayor de proteínas (400 µg) para su identificación mediante espectrometría de masas en tándem.

## **6. Digestión de proteínas en gel e identificación de proteínas por PMF y MALDI-TOF/TOF**

La identificación de las manchas proteicas presentes en los respectivos fragmentos de gel se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”- CSIC, (IPBLN, CSIC, Granada) para las identificaciones por PMF; y en la Unidad de Proteómica del SCAI de la Universidad de Córdoba (UCO), miembro de la Plataforma en Red de Proteómica Carlos III, ProteoRed-ISCI, para las identificaciones por MALDI-TOF/TOF.

En ambos casos, los fragmentos de gel escindidos se digirieron con tripsina y se depositaron sobre la placa MALDI de manera automática en una estación *ProPrep II (Digilab Genomic Solutions Inc., U.K.)* con las siguientes condiciones: dos pasos de destinción de 30 min. con 50% acetonitrilo/100 mM bicarbonato amónico; dos rondas de lavado con 25 mM bicarbonato amónico durante 15 min. y 25 mM bicarbonato amónico/50% acetonitrilo durante 15 min., respectivamente; deshidratación con 100% acetonitrilo durante 5 min. y secado de la muestra; hidratación con 10 µl de tripsina a 12.5 ng/µl en 25 mM bicarbonato amónico durante 10 min. a temperatura ambiente y posterior digestión a 37°C durante 12 h. La digestión se detuvo añadiendo a cada muestra 10 µl de una solución de TFA al 0.5% en agua. Los péptidos resultantes de la digestión con tripsina, se purificaron mediante una microcolumna de resina C18 (*ZipTip, Millipore*), eluyéndose directamente con una solución de matriz (3 mg/ml de ácido α-ciano-4-hidoxicinámico en 70% acetonitrilo/0.1% TFA) sobre la placa MALDI en un volumen de 1 µl.

La identificación de las proteínas mediante PMF se realizó empleando un Voyager-DE PRO MALDI-TOF (AB SCIEX, CA) en modo positivo reflector. Los espectros fueron internamente calibrados usando los iones a 842.5 m/z y 2211.1 m/z derivados de la autodigestión triptica. Para elaborar la lista de picos se empleó el *software Data Explorer 4.0 (Applied Biosystems)*. Para la identificación de las proteínas a partir de la PMF se empleó el motor de búsqueda Mascot sobre la base de datos *Swissprot* limitando la categoría taxonómica a *Mus musculus* con los siguientes parámetros: el error máximo permitido en la búsqueda fue 50 ppm, el número máximo de errores en el corte de la proteasa tripsina fue uno, la modificación fija fue cisteína carbamidometilación (+57Da) y las modificaciones variables fueron oxidación de metionina (+16Da), acetilación N-terminal (+42Da) y fosforilación (+80Da). Las

manchas proteicas fueron identificadas con un rango de cobertura de secuencia variable entre el 8 al 70% (media 27%).

EL otro conjunto de muestras se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF en un espectrómetro de masas *4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems)* equipado con extracción retardada, reflector y en modo positivo, en un rango de masa/carga ( $m/z$ ) de 800 a 4000 Da, con un voltaje de aceleración de 20 kV. Se realizó calibración interna de los espectros utilizando las relaciones masa/carga ( $m/z$ ) de los péptidos resultantes de la autólisis de la tripsina porcina ( $M+H^+=842.509$ ,  $M+H^+=2211.104$ ), obteniéndose de esta manera una precisión en la medida de las  $m/z$  de  $\pm 20$  ppm. Los espectros de fragmentación (MS/MS) se seleccionaron en función de una ratio S/N mínima de 5, un nº máximo de picos en 65 y una densidad máxima de 50 picos por 200 Da. Para cada precursor seleccionado para el análisis MS/MS, los valores de masa de los fragmentos entre 60 Da hasta 10 Da por debajo de la masa del precursor se emplearon para la identificación del péptido. La identificación de la proteína se asignó por PMF siendo confirmada por el análisis MS/MS de al menos 3 péptidos para cada muestra, empleando *Mascot 1.9 (Matrixscience)* como motor de búsqueda sobre la base de datos *Swissprot* limitando la categoría taxonómica a *Mus musculus*. Para la búsqueda se establecieron los criterios de carbamidometilación completa de los residuos de cisteína y oxidación parcial de los residuos de metionina. El error máximo permitido en la búsqueda fue de 100 ppm y el número máximo de errores en el corte de la proteasa tripsina fue uno.

## **7. Western-Blot**

Muestras de suero sin fraccionar (5  $\mu$ g) de ratones WT y CD38 $ko$  fueron separadas en 1D en geles de gradiente *Criterion XT precast 4-12% Bis-Tris (Bio-Rad)*. Tras la electroforesis SDS-PAGE, las proteínas fueron transferidas en membranas de PVDF (Millipore). Tras la transferencia las membranas fueron teñidas con *Ponceau Red solution (0.1% (w/v) Ponceau S en 5% (v/v) Ácido acético (Sigma-Aldrich)* para estimar la eficacia de la transferencia y para normalizar la cantidad de proteína. Los Ac. primarios que se emplearon fueron *APOA1 Goat anti-Mouse Polyclonal*, *APOE Rabbit anti-Mouse Polyclonal (Lifespan Biosciences)*; *Ig Kappa Light Chain Goat anti-Mouse Polyclonal (HRP) (Lifespan Biosciences)*, *Ficolin-A Rabbit anti-Mouse Polyclonal* (cortesía de Yuichi Endo, PhD, Dept. of Immunology/Radioisotope Research Center, Fukushima Medical University School of Medicine, Japón). Como Ac. secundarios se emplearon los anticuerpos HRP conjugados Goat anti-rabbit, or Goat-anti-mouse

(Promega). Para el revelado de las membranas se empleó el reactivo de detección (Bio-Rad) y la visualización de las bandas se realizó con el escáner de quimioluminiscencia *Chemidoc XRS (Bio-Rad)*. El análisis por densitometría de las bandas se llevó a cabo con el programa informático *Quantity-One 5.04 software (Bio-Rad)*. Las intensidades de las bandas fueron determinadas en comparación con la carga total de proteína por pocillo establecida con la tinción con *Ponceau Red*.

## **8. ELISA**

Los niveles de SAA y Ficolina-1 en suero de ratón se determinaron por los *kits* comerciales de *Tridelta Development Ltd* (Maynooth, Irlanda) y *USCN Life Science Inc.* (Wuhan, China), respectivamente. Para el desarrollo experimental se siguieron las indicaciones del fabricante para cada caso. Para el análisis de los datos se empleó el programa estadístico Graph Pad Prism, versión 5 (San Diego, CA), considerando diferencias significativas  $p < 0.05$  (\*);  $p < 0.01$  (\*\*) o  $p < 0.001$  (\*\*\*). Los datos aparecen en unidades de  $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$  para SAA y  $\text{ng/ml} \pm \text{SD}$ .

## **9. Determinación de citoquinas en suero**

Para la determinación de citoquinas en el suero de ratones no inmunizados e inmunizados se empleó el *kit multiplex Bio-Plex Pro Mouse Cytokine (Bio-Rad)* que permite la detección simultánea de citoquinas en suero. En nuestro caso, las citoquinas determinadas fueron: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1 e IL-4. Los ensayos se realizaron de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La determinación de las concentraciones para cada citoquina se realizó mediante el ajuste sobre una curva patrón logística de cinco parámetros. El análisis de los datos se realizó mediante el programa estadístico Graph Pad Prism, versión 5 (San Diego, CA), considerando diferencias significativas  $p < 0.05$  (\*);  $p < 0.01$  (\*\*) o  $p < 0.001$  (\*\*\*); los datos aparecen en unidades de  $\text{pg/ml} \pm \text{SD}$  (SD, desviación estándar).

## **10. Análisis de poblaciones celulares mediante citometría de flujo**

Tras el sacrificio de los ratones mediante asfixia por  $\text{CO}_2$  se extrajeron el bazo para la obtención de una suspensión celular mediante disgregación manual y la tibia y fémur de cada pata posterior de cada ratón para la obtención de células de médula ósea. La obtención de células de sangre se realizó por punción directa al corazón

incorporando heparina a la sangre extraída para evitar la coagulación. Los eritrocitos fueron eliminados mediante lisis con cloruro amónico durante 10 min. a 4°C. Para el bloqueo de los receptores Fc de las células aisladas se empleó el anticuerpo monoclonal anti CD16/CD32 (*Mouse BD Fc Block ; BD Biosciences*). Posteriormente se marcaron las células con uno o varios anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluorocromos en diversas combinaciones. Las mediciones por citometría de flujo de las poblaciones celulares se llevaron a cabo en un FACSCalibur (BD). Los análisis de los datos de citometría de flujo fueron realizados con el software FlowJo 7.6 (Árbol Star, Inc.). Los anticuerpos monoclonales empleados anti-Gr1 FITC, anti-CD11b APC, anti-CD115 APC fueron adquiridos de Miltenyi Biotec. Los anticuerpos anti-Ly6C FITC y anti-Ly6G PE fueron adquiridos de BD Bioscience. Los anticuerpos anti-CD184 Alexa Fluor 647, anti-CD3 FITC, anti-CD19 FITC, anti-B220 FITC, anti-CD11b FITC y anti-c Kit (anti-CD117) PE fueron adquiridos de BioLegend.

### **11. Activación *in vivo* de células iNKT**

La inducción *in vivo* de las células iNKT en ratones B6 WT y CD38<sup>ko</sup> se llevó a cabo con la inyección intraperitoneal de 2 µg de α-GalactosilCeramida (KRN 7000) en 200 µl de PBS. Tras 72h se sacrificaron los ratones para el marcaje de las células iNKT en bazo como CD1d<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup> y el marcaje en médula ósea de la población identificada como precursores de osteoclastos como B220<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> CD11b<sup>-low</sup> CD115<sup>+</sup> CD117<sup>+</sup>. Para la detección del tetrámero CD1d se empleó el fluorocromo PE adquirido de Proimmune.

### **12. Diferenciación *in vitro* hasta osteoclastos y detección de TRAP en sobrenadantes de cultivo**

Se obtuvieron suspensiones celulares de médula ósea a partir del fémur y tibia de las patas posteriores de ratones in inmunizar y ratones inmunizados con Col II+CFA tras 20 días desde la 1<sup>a</sup> inmunización. Los eritrocitos fueron eliminados mediante lisis con cloruro amónico durante 10 min. a 4°C. Las células de médula ósea aisladas se resuspendieron en medio de cultivo α-MEM (Medio Mínimo Esencial) suplementado con 0.3M de ácido-L-ascórbico y 10mM de β-Glicerofosfato. El primer día las células de médula ósea se sembraron en frascos de cultivo con M-CSF (20 ng/ml) a una concentración de 1,5x10<sup>6</sup> células/ml. Al día siguiente las células no adherentes fueron descartadas y las células adherentes se seleccionaron para su siembra en placas de 96 pocillos a razón de 200.000células/pocillo en 200 µl. Las

células fueron cultivadas sin o con M-CSF (20 ng/ml) + RANKL (100 ng/ml). M-CSF y RANKL fueron adquiridos de Mylteny Biotec. Cada 4 días y hasta el día 14 se procedió al cambio del medio de cultivo incorporando los estímulos si era correspondiente, reservando los sobrenadantes para medir la actividad de la enzima fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), marcador específico de células osteoclasticas. A los 14 días, una vez reservado el sobrenadante se procedió además a la tinción de las células en las placas de cultivo para la detección de TRAP. Para la medida de TRAP se empleó el kit comercial *Acid Phosphatase, Leukocyte* (TRAP) (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección de TRAP se empleó 75 µl de los sobrenadantes usando un procedimiento adaptado al realizado para el marcaje *in situ* en las células en las placas midiendo la absorbancia para TRAP a 540nm.

### **13. Extracción de ARN de patas de ratón y análisis de la expresión génica mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) cuantitativa a tiempo real**

En el momento del sacrificio de los ratones en los experimentos de AIC, se extrajeron las dos patas traseras de cada ratón por encima de la articulación distal, se eliminó la piel y se congelaron inmediatamente para llevar a cabo los estudios de ARN. Las patas congeladas se trituraron con ayuda de un mortero de porcelana y N. líquido y una vez trituradas, se homogenizaron con 1 ml de Qiazol (Qiagen). Tras dejar descongelar, el homogenizado se incubó 15 min a temperatura ambiente, para posteriormente centrifugarlo 8 min a 13000 rpm a 4° C.

Se recogió la fracción líquida a la que se le añadió 200 µl de Cloroformo (Chloroform, ≥99.8%; Sigma) por cada ml de Qiazol inicial, se agitó vigorosamente y se incubó 2-3 min a temperatura ambiente, tras los que las muestras se centrifugaron 20 min a 13000 rpm a 4° C. Se obtuvieron tres fases de las que se recogió la fase superior transparente, se le añadió 500 µl de Isopropanol (2-Propanol, para biología molecular, ≥99%; Sigma) por cada ml de Qiazol inicial y se homogenizó la mezcla mediante vórtex. Dicha mezcla se incubó 10 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó 10 min a 13000 rpm a 4° C y de este modo se obtuvo un precipitado blanquecino que contenía el ARN. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 75% frío, centrifugandose de nuevo 5 min a 8000 rpm a 4° C. Se eliminó completamente el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 50 µl de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas.

Los precipitados resuspendidos de las dos patas de cada ratón se unieron y posteriormente, dicho ARN se limpió siguiendo el protocolo "RNA Cleanup" del kit

“RNeasy mini kit” de Qiagen (catálogo nº 74104) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se llevó a cabo el paso opcional para la digestión de ADN. La cantidad de ARN total se midió espectrofotométricamente mediante *NanoDrop* (Thermo Fisher).

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó a partir de 2 µg de ARN total usando la reversotranscriptasa SuperScript III (Invitrogen) por el método de los cebadores aleatorios, y usando las condiciones que recomienda el fabricante: un volumen final de reacción de 20 µl que contenía 200 unidades (U) de SuperScript III, 5 mM de cebadores aleatorios (100 ng/µl, Roche Diagnosis, Alemania), 0.5 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP), 20 U de inhibidor de RNasa RNaseOUT (Invitrogen), y tampón de reversotranscripción 1X.

Las PCRs cuantitativas a tiempo real se realizaron en un termociclador CFX96 (Bio-Rad). Cada 10 µl de mezcla de reacción contenía: 1X iQ-SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 200 nM de cada cebador y 10 ng de ADNc. El programa de PCR consistió en: 10 min de incubación a 95 °C para la activación de la Taq DNA polimerasa de “arranque caliente” (*Hot Start*), seguido de 40 ciclos de 15 segundos (s) a 95 °C, y 1 min a 60 °C. La fluorescencia emitida por el SYBRGreen se midió al final del paso de extensión de cada ciclo. La especificidad de amplificación por PCR se comprobó mediante la realización de una curva de desnaturalización del amplicón una vez finalizada la PCR. Para ello se efectuó un calentamiento desde 65 °C a 100 °C, incrementando la temperatura 0.5 °C cada 10 s.

Las cuantificaciones se realizaron a partir de tres reacciones de PCR por cada muestra. El ciclo umbral (Ct) se calculó por el programa informático del equipo de la PCR cuantitativa a tiempo real y fue el ciclo en el que comenzaba a detectarse el amplicón de forma exponencial. Los resultados obtenidos se normalizaron internamente a los niveles de expresión de TBP (TATA-box-binding protein) que fue medida en paralelo en cada muestra.

La proporción de transcrito presente en las muestras se calculó usando el método de cuantificación realtiva  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [1]. Los resultados representan la cantidad relativa de amplicón en cada muestra de ratón respecto al nivel de transcrito de una muestra de ratón wt.



## REFERENCIAS

1. Livak, KJ., et al., *Analysis of relative gene expression data using real- time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method*. *Methods*, **2001**. 25: p. 402–408.

# *Resultados*



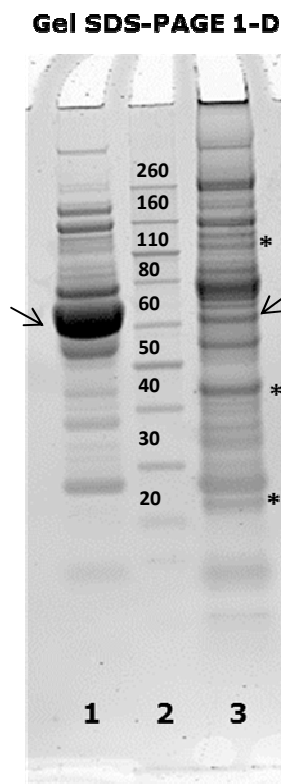
## F) RESULTADOS

### 1. Fraccionamiento de la muestra

Previamente al empleo de las muestras de suero para el análisis proteómico mediante 2D-DIGE, se llevó a cabo un estudio acerca de la eficacia del **fraccionamiento mediante *Proteominer*** en la detección de proteínas poco abundantes en el suero. Este fraccionamiento es necesario debido al elevado rango dinámico de concentraciones de las proteínas en el suero lo que limita su uso posterior, por ejemplo, para análisis proteómicos de expresión diferencial mediante 2D-DIGE. Para realizar este fraccionamiento se empleó el sistema de librerías de hexapéptidos conocido comercialmente como *Proteominer* que permite la ecualización de la muestra y la variación del rango dinámico de concentraciones de la muestra permitiendo la detección de proteínas en baja concentración [2]. La Figura 1 corresponde con un gel 1-D teñido con *SyproRuby* donde puede observarse la aparición de nuevas bandas correspondientes a proteínas que en la muestra sin fraccionar no se identifican y la variación del rango de concentración de proteínas que pueden detectarse tanto en el suero sin fraccionar como en el suero tras el fraccionamiento (\*).

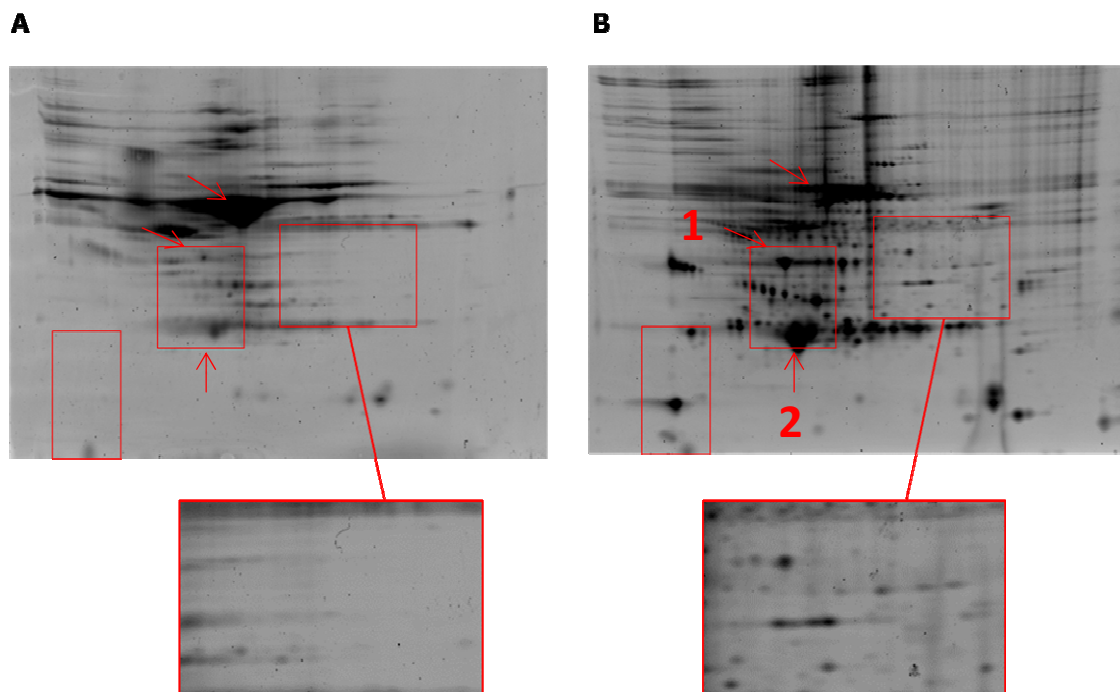
Sobre este respecto, al contrario de lo que sucede con el fraccionamiento mediante depleción cuyo objetivo es la eliminación de las proteínas con alta concentración en la muestra, en este caso, puede observarse cómo en la muestra fraccionada aún están presentes proteínas mayoritarias como por ejemplo, la Albúmina Sérica pero a una concentración mucho menor a la del suero de partida (flechas).

**Figura 1.** Imagen de gel 1-D para (1) muestra de suero sin fraccionar, (2) Marcador de Pm, (3) muestra de suero tras fraccionamiento con *Proteominer*



Mediante el programa informático *QuantityOne* (Bio-Rad) se determinó mediante densitometría la intensidad de las respectivas bandas para la Albúmina Sérica tanto en el carril 1 como el 3 (Figura 1, flechas). Así, a partir de los valores de *Volumen ajustado CNT\*mm2* (3551.46 para el carril 1 y 460.68 para el carril 2) resulta una reducción en la concentración de esta proteína superior al 75%.

Además, es en la comparación mediante geles 2-D entre muestras de suero sin fraccionar y tras el fraccionamiento con *Proteominer* donde se observa de una manera más destacada la variación en el rango de concentraciones séricas y la aparición de nuevas manchas proteicas que en el suero sin fraccionar resultan imposibles de detectar (Figura 2).



**Figura 2.** Comparativa entre dos geles 2-D de suero de ratón sin fraccionar (A) y tras el fraccionamiento con *Proteominer* (B). Los cuadros destacados en rojo detallan regiones de los geles donde comparando el gel A y B se aprecia el aumento de las manchas proteicas detectadas como resultado del fraccionamiento. Las flechas destacan la variación en la intensidad de las manchas detectadas resultado de la eualización de la muestra

De forma similar a lo realizado para las bandas en el gel 1-D correspondientes a la Albúmina Sérica, en las imágenes de los geles 2-D de muestras de suero antes y después del fraccionamiento con *Proteominer* se determinaron mediante densitometría

las intensidades de ciertas manchas proteicas para conocer la eficacia en el proceso de enriquecimiento. En este caso, a diferencia del caso de la albúmina donde lo que se aprecia es una reducción en la concentración relativa de dicha proteína tras el fraccionamiento, en los spots 1 y 2 señalados por las flechas rojas en la Figura 2 se observa un aumento de las concentraciones relativas de dichas manchas proteicas en el suero fraccionado respecto al suero sin fraccionar. Así, para la mancha proteica 1 los datos de densitometría arrojan unos valores de 178.71 y 535.94, para la muestra sin fraccionar y fraccionada respectivamente, lo que arroja un aumento en la concentración relativa en torno a 3 veces. Para la mancha proteica 2 el enriquecimiento tras el fraccionamiento de esta mancha proteica está alrededor de 4 veces (277.68 y 1165.31, valores de densitometría para la muestra sin fraccionar y fraccionada respectivamente).

En el Anexo I, la tabla correspondiente muestra las **concentraciones** séricas o plasmáticas de las proteínas identificadas de muestras de suero tras fraccionamiento con *Proteominer* a partir de un primer análisis de un gel 2D con aproximadamente 150 µg de cantidad de muestra en el que 105 manchas proteicas fueron identificadas con éxito mediante PMF correspondiéndose con 48 proteínas distintas (Anexo II, tabla con las proteínas identificadas mediante MS). En un segundo análisis, a partir de un gel 2D con 400 µg, adicionalmente 42 manchas proteicas fueron identificadas mediante MS/MS correspondiendo a 26 proteínas distintas (Anexo III, tabla con las proteínas identificadas mediante MS/MS). En resumen, 63 proteínas distintas fueron identificadas con 20 de ellas representadas por más de una mancha proteica (hasta 9 manchas proteicas distintas como máximo).

A partir de los datos de concentración de las proteínas identificadas (Anexo I) se observa que se identifican 7 de las 10 proteínas más abundantes en suero (Proteínas Alta Concentración, PAC, rango fisiológico entre 1-100 mg/ml), 13 proteínas de las 63 pertenecen a un grupo de Proteínas de Concentración Media (PCM, rango de concentración entre 0.1-1 mg/ml), 10 proteínas de las identificadas pertenecen a un grupo de Proteínas de Concentración Baja (PCB, rango fisiológico inferior a 100 µg/ml) y otras 17 proteínas que también pertenecen a este último grupo tienen una concentración por debajo de 1 µg/ml. A modo de ejemplo de proteínas para cada grupo aparecen las siguientes: PAC ( $\alpha$ -1 Antitripsina, Apo A-I, Albúmina sérica), PCM (Ceruloplasmina, proteína de unión a Vitamina D, Transtiretina), PCB (Apo E, Clusterina, Proteína Sérica Amiloide A1-A2).

Dentro de las proteínas identificadas, 9 de ellas pueden considerarse como proteínas celulares que pueden ser secretadas a través de exosomas o de vesículas de pequeño tamaño [3]. Dentro de este grupo podemos señalar la actina, proteína que puede llegar a representar en torno al 10-20% del total de proteínas de una célula, pero que en condiciones fisiológicas normales suele estar presente en plasma o suero a una concentración muy baja dentro del rango de concentración de  $\mu\text{g/ml}$  o incluso inferior [4].

A continuación, se destacan algunas proteínas cuyo análisis más en profundidad de las identificaciones realizadas permite señalar algunos aspectos relevantes tanto del proceso de fraccionamiento realizado como del modelo experimental que se llevó a cabo. Entre otras proteínas a destacar está la identificación de varias subunidades del Proteasoma 20S cuya concentración varía desde 20 ng/ml en el suero de ratón en situación basal hasta 20  $\mu\text{g/ml}$  en ratones con tumores sólidos [3, 5] siendo un grupo de proteínas descritas con función estructural en el suero humano y de ratón [3]. Otra proteína que ha sido identificada que puede señalarse de forma destacada es el Factor de coagulación V, presente en el plasma en forma de cadena simple a una concentración de 6mg/ml y que puede considerarse como una proteína con una alta concentración en el suero. Esta proteína (nº 253) ha sido detectada en el presente estudio con un Pm aparente de 50 kDa mientras que ha sido descrita en ratón como forma glicosilada y con un Pm aparente en geles SDS-PAGE alrededor de 300 kDa. [6]. Esta aparente contradicción queda solventada al observarse que el tamaño del fragmento identificado para esta proteína corresponde con el fragmento N-terminal generado por la acción de la trombina y la proteína C activada [6] y que los tres péptidos fragmentados por MS/MS correspondientes a la mancha proteica nº 253 (identificada como Factor de Coagulación V) se localizan dentro del fragmento de 50 kDa del extremo N-terminal de la proteína completa.

Algo parecido respecto a la anterior proteína sucede con la identificación de la proteína Complemento C4-B, proteína secretada de gran tamaño consistente en tres subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  unidas por enlaces disulfuro, de la que se han identificado varios spots identificados como tal. La identificación realizada por MS/MS permite señalar que las manchas proteicas 176,182 y 518 (Anexo III, imagen de gel 2-D) corresponden con la subunidad  $\beta$  intacta, los nº 308 y 309 (Anexo III, imagen de gel 2-D) con la subunidad  $\gamma$  y los nº 365 y 381 (Anexo III, imagen de gel 2-D) corresponden con fragmentos de la subunidad  $\alpha$ . Así, los respectivos PM corresponderían con los fragmentos generados de C4b debido a la activación de la cascada del Complemento

que además provocaría el incremento en suero de la concentración de estos fragmentos.

Respecto a la proteína Complemento C3, dos manchas proteicas han sido identificadas con este resultado (nº 208, imagen gel 2-D Anexo II, y nº 190, imagen gel 2-D Anexo II) aunque atendiendo a su Pm y pl, y a la secuencia de los fragmentos peptídicos que se identifican como C3 (<http://www.uniprot.org/uniprot/P01027>); se corresponderían de forma más precisa a la cadena beta de C3 que es generada como resultado de la actividad proteolítica de la convertasa de C3 que escinde la cadena  $\alpha$  liberando la anafilotoxina C3a y generando C3b (cadena beta + cadena  $\alpha'$ ). Además, resulta destacable señalar la mancha proteica nº 208 aparece expresada de forma significativa en los ratones afectados de AIC respecto a los no afectados de AIC (Tabla 3) lo que sugiere la activación del Complemento.

De las seis manchas proteicas identificadas como Apolipoproteína E (ApoE), tres de ellas fueron identificadas como tal mediante MS/MS, nº 305, nº 326 y nº 489, siendo el nº 326 el de mayor intensidad. Destacar la mancha proteica nº 451 identificada por PMF como una isoforma de bajo peso molecular de ApoE [7]. La mancha proteica nº 451 presenta un Pm muy similar a la anterior al encontrarse muy próximas y la identificación por MS/MS afianza la identificación como ApoE ya que uno de los péptidos fragmentados se corresponde con el péptido  $^{262}\text{LQAEIFQAR}^{270}$  (*Mascot ion score*=70, *P*=4.2e-006; Anexo III, Tabla identificaciones por MS/MS). Este péptido ha sido descrito de gran utilidad en los análisis de cuantificación SRM, considerándose como un péptido proteotípico de ApoE [8].

## **2. Clasificación de las proteínas identificadas**

Las proteínas identificadas fueron clasificadas en función del proceso biológico en el que participan de acuerdo con el análisis mediante *Gene Ontology Term Enrichment* (sitio *web AmiGO*). En la tabla siguiente pueden observarse respectivamente las cinco primeras categorías para la clasificación de las proteínas identificadas mediante el proceso biológico.



**Tabla 1. Clasificación de las proteínas identificadas en función del proceso biológico**

<i>Gene Ontology</i>	<i>P</i> -valor	Frecuencia	Frecuencia general	Proteínas
Definición				
Respuesta de defensa	2.16e-10	19/60 (31.7%)	898/25387 (3.5%)	ATIII, THRB, GAPDH, FN, CO3, KNG1, IGG2B, SAA2, CFAH, ApoA-IV, PSA4, Apo-E, SAA1, IGHM, C1QB, FCN1, FETUA, Apo-AI, MBL2
Activación de proteínas	9.20e-10	8/60 (13.3%)	53/25387 (0.2%)	ATIII, CO3, CO4B, IGG2B, CFAH, C1QB, FCN1, MBL2
Procesos metabólicos	1.24e-09	33/60 (55.0%)	3790/25387 (14.9%)	TRFE, ATIII, THRB, GAPDH, FN, CO3, PSB8, PPM1G, CO4B, GPI-PLD, Serpin A1c, MRP-L39, GRP75, HBB1, Serpin A1a, PSA4, IGG2B, CFAH, PSA6, PSA2, ApoA-IV, PSB3, PSB1, PLMN, PSA1, Apo-E, IGHM, C1QB, FCN1, ApoA-II, FETUA, Apo-AI, MBL2
Respuesta inflamatoria	2.08e-09	14/60 (23.3%)	430/25387 (1.7%)	ATIII, THRB, FN, CO3, KNG1, IGG2B, SAA2, CFAH, PSA1, Apo-E, SAA1, FETUA, Apo-AI, MBL2
Respuesta inmunitaria humoral	2.11e-09	9/60 (15.0%)	94/25387 (0.4%)	CO3, IGHA, CO4B, IGG2B, CFAH, IGHM, C1QB, FCN1, MBL2

### 3. Diseño experimental para análisis 2D-DIGE

En ratones C57BL/6J y CD38*ko* la incidencia de la AIC es aproximadamente del 70% del total de los ratones inmunizados a pesar de que todos ellos desarrollan anticuerpos anticolágeno II. Como ya ha sido comentado anteriormente, los ratones CD38*ko* desarrollan una artritis menos severa que los ratones WT [1]. Debido a esto, resultaba de interés estudiar en suero posibles diferencias en los perfiles de proteínas expresadas entre ratones AIC<sup>+</sup> y AIC<sup>-</sup> y entre ratones WT y CD38*ko* inmunizados con COL II. Se establecieron entonces dos categorías entre los ratones inmunizados con COL II + CFA en función de si los ratones eran WT o CD38*ko* y dentro de cada grupo entre ratones con afectación clínica y no afectación clínica de la artritis, resultando como combinación 4 grupos distintos (Tabla 2).

**Tabla 2**

Gel	Cy3	Cy5	Cy2
A	WT 2+	KO 16+	mezcla de las 16 muestras
B	WT 19-	KO 7-	mezcla de las 16 muestras
C	KO 9-	WT 11+	mezcla de las 16 muestras
D	KO 3+	KO 20-	mezcla de las 16 muestras
E	WT 10-	WT 13+	mezcla de las 16 muestras
F	KO 8+	WT 20-	mezcla de las 16 muestras
G	WT 17+	WT 16-	mezcla de las 16 muestras
H	KO 2-	KO 14+	mezcla de las 16 muestras

#### **4. Análisis de las proteínas expresadas diferencialmente**

Para determinar las proteínas expresadas diferencialmente entre las dos categorías establecidas se aplicó el test ANOVA de 2 vías considerando diferencias significativas para valores de  $P < 0.05$ . Para la comparación entre ratones con afectación frente a no afectación, 28 manchas proteicas resultaron significativas mientras que en la comparación entre ratones WT frente a CD38ko resultaron 7 manchas proteicas con  $P < 0.05$ . Cuando se consideró de forma conjunta la interacción de ambas categorías, 7 manchas proteicas resultaron estadísticamente significativas.

Las 28 manchas proteicas diferentes entre los ratones AIC+ y AIC- (independientemente de si son B6 WT o CD38ko) aparecen recogidas en la Tabla3.

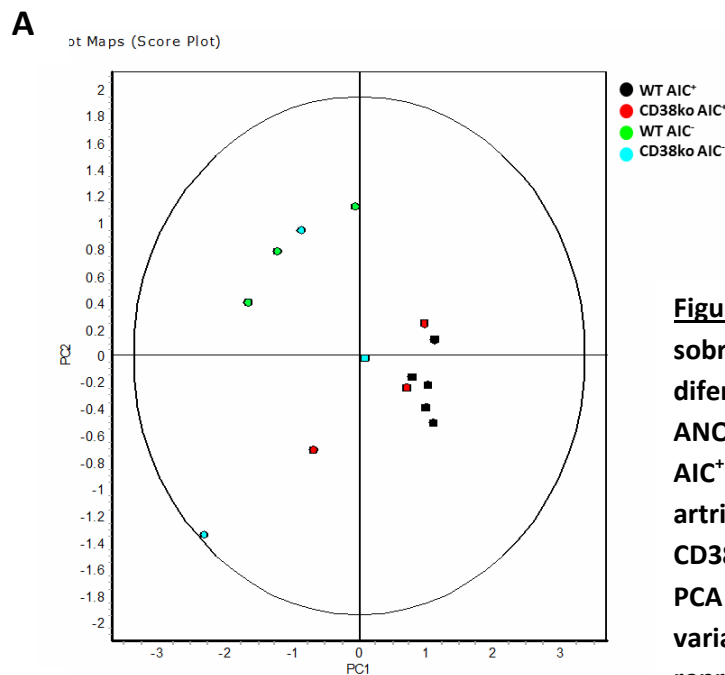
**Tabla 3. Proteínas sobreexpresadas en el suero de ratones AIC<sup>+</sup> y AIC<sup>-</sup> con valores de  $p < 0.05$  para ANOVA de 2 vías**

<b>AIC<sup>+</sup></b>				
<b>código</b>	<b>Identificación</b>	<b>P value según afectación clínica</b>	<b>P value según tipo Ratón</b>	<b>interacción 2 categorías</b>
419	no identificada	0,0181	0,336	0,645
407	Hemoglobina subunidad alpha	0,0247	0,802	0,157
427	Hemoglobina subunidad alpha	0,0266	0,275	0,928
402	no identificada	0,0282	0,596	0,804
414	no identificada	0,0297	0,554	0,773
430	Hemoglobina subunidad beta1	0,031	0,355	0,996
208	Complemento C3	0,0348	0,331	0,337
429	no identificada	0,0355	0,284	0,799
406	no identificada	0,0361	0,837	0,306
305	ApoE	0,0373	0,0365	0,0489
412	Hemoglobina subunidad alpha	0,0412	0,327	0,981
336	no identificada	0,0473	0,292	0,0388

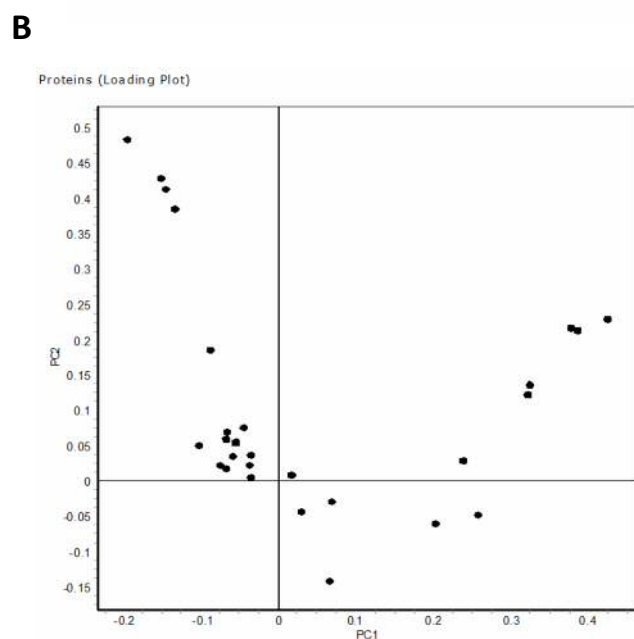
<b>AIC<sup>-</sup></b>				
<b>código</b>	<b>Identificación</b>	<b>P value según afectación clínica</b>	<b>P value según tipo Ratón</b>	<b>interacción 2 condiciones</b>
361	Apo AI	6,41E-05	0,356	0,179
296	no identificada	8,18E-04	0,131	0,0226
379	Apo AI	1,32E-03	0,448	0,798
285	Recoverina	2,23E-03	0,35	0,365
405	no identificada	2,88E-03	0,204	0,0369
288	Proteína fosfatasa 1G	5,39E-03	0,2	0,338
392	no identificada	6,65E-03	0,106	0,298
444	Beta 2 microglobulina	7,23E-03	0,0787	0,153
404	Major urinary protein 20	7,82E-03	0,0381	0,07
292	no identificada	8,28E-03	0,38	0,0451
364	Apo AI	0,0151	0,938	0,147
461	no identificada	1,57E-02	0,0685	0,124
323	no identificada	0,0169	0,204	0,445
368	Apo AI	0,022	0,914	0,954
258	Apo AIV	0,0281	0,0997	0,384
388	Apo AI	0,0415	0,79	0,559

A partir de estos datos, se aplicó un análisis estadístico multivariante mediante análisis de componentes principales (PCA), para este análisis se consideraron las manchas proteicas estadísticamente significativas con valor de  $P < 0.05$  y presentes al menos en el 75% de las muestras de cada grupo en estudio. Mediante el análisis por componentes principales se observa en la distribución que 7 de los 8 ratones con

artritis se distribuyen de forma similar constituyendo un grupo bastante homogéneo (Figura 3). De la misma forma, 4 de los 6 ratones sin afectación clínica se agrupan en una misma zona (cuadrante superior izquierdo), mientras que los 2 restantes parecen seguir un patrón distinto.

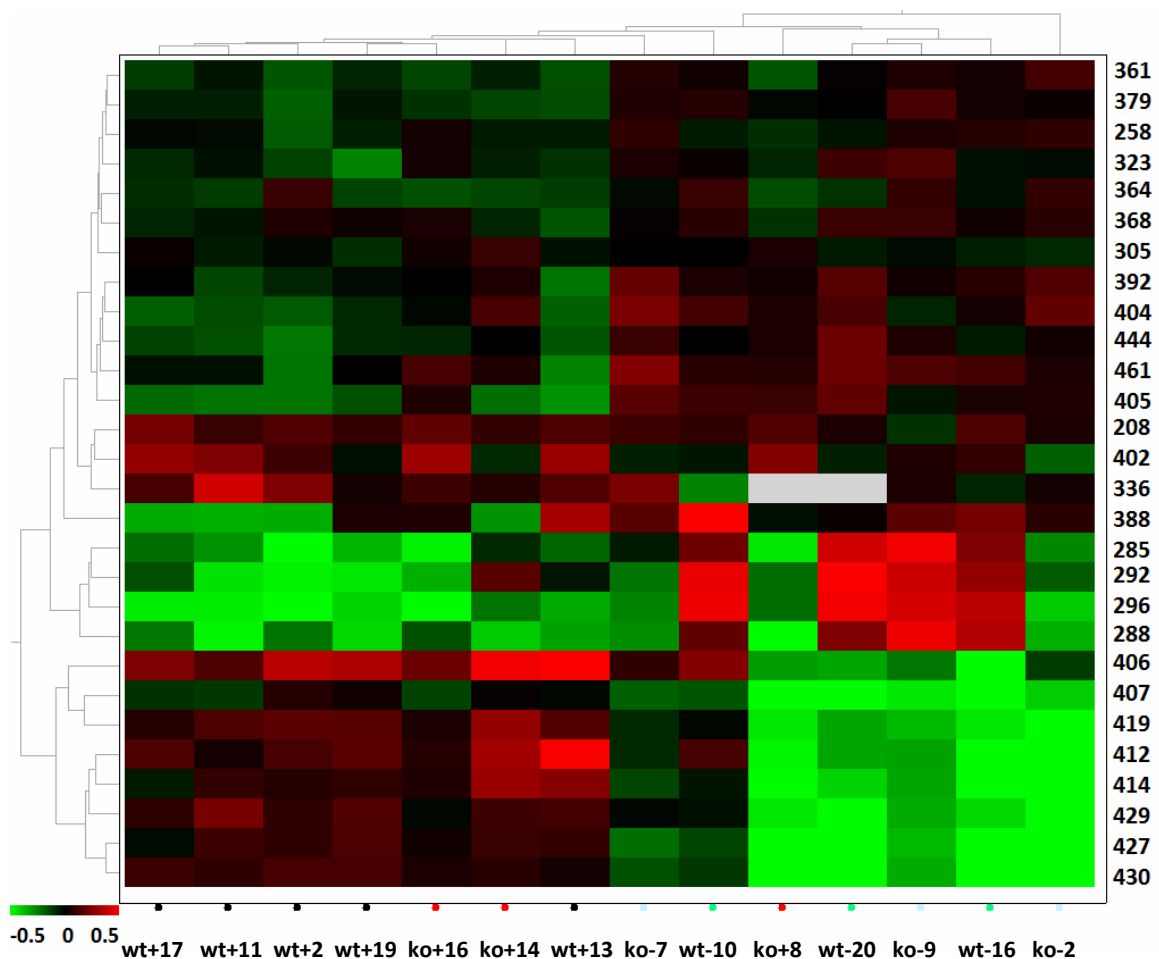


**Figura 3.** Representación del PCA sobre las proteínas expresadas diferencialmente para  $P < 0.05$  para ANOVA de 2-vías entre ratones AIC<sup>+</sup> (WT y CD38ko afectados de artritis) y ratones AIC<sup>-</sup> (WT y CD38ko no afectados de artritis). El PCA 1 constituye el 63.4% de la variabilidad mientras que el PCA 2 representa el 21.2 % de la variabilidad. (A) Distribución de los individuos para cada grupo en función de los PCA 1 y PCA 2. (B) Distribución de las proteínas expresadas diferencialmente entre los ratones AIC<sup>+</sup> y ratones AIC<sup>-</sup> en función de los PCA 1 y PCA2.



Además, se llevó a cabo un análisis de agrupación o *clustering* jerárquico no supervisado de forma que se realiza una clasificación y agrupamiento en función de

los patrones de expresión de las muestras del ensayo. En la Figura 4 conocida como dendograma o *heat map*, se observa cómo los ratones con afectación clínica se agrupan juntos a excepción del ratón CD38ko nº8 mientras que los ratones no afectados también se agrupan juntos y con un patrón de expresión distinto al de los ratones afectados. La representación del dendograma concuerda con el PCA y demuestra que los ratones con AIC<sup>+</sup> pueden ser separados de los AIC<sup>-</sup> en función del perfil de expresión de proteínas en suero. Un análisis más en detalle de las proteínas sobreexpresadas en los ratones AIC<sup>+</sup> señala que la mayoría de ellas se corresponden con subunidades de la hemoglobina. En el ratón CD38ko nº8, estas proteínas y otras 4 que no pudieron ser identificadas se encuentran con un nivel de expresión relativo inferior al que deberían tener en función de su grupo lo que podría explicar esta clasificación más próxima a los ratones AIC<sup>-</sup>.

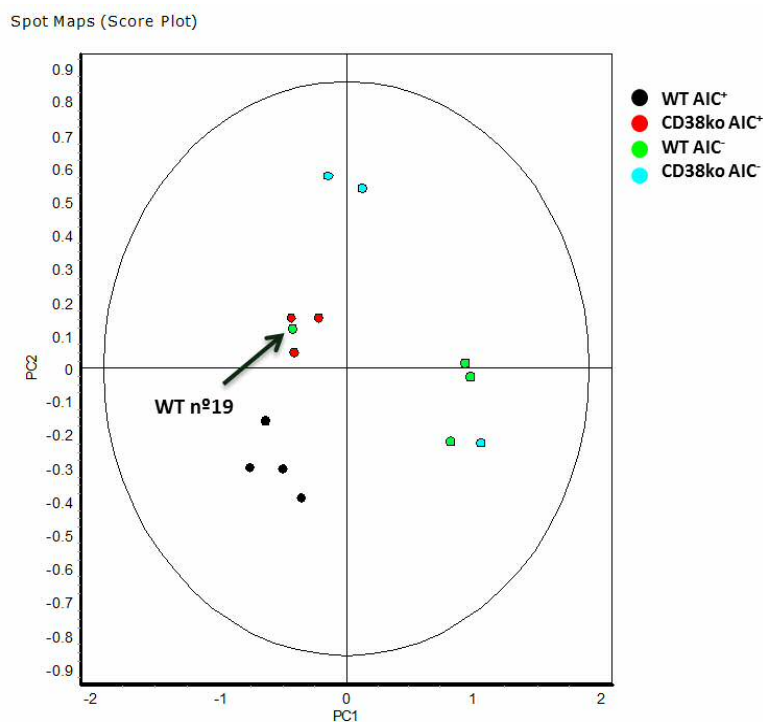


**Figura 4.** Representación en dendrograma de las proteínas expresadas diferencialmente para  $P < 0.05$  para ANOVA de 2-vías entre ratones AIC<sup>+</sup> (WT y CD38ko afectados de artritis) y ratones AIC<sup>-</sup> (WT y CD38ko no afectados de artritis). Los ratones con AIC<sup>+</sup> se distribuyen de forma conjunta tal y como se adivinaba en la representación del PCA de la figura X a excepción del CD38ko n°8. Gracias al código de colores puede identificarse además la distinta expresión entre los dos grupos de ratones en función de la afectación de la artritis

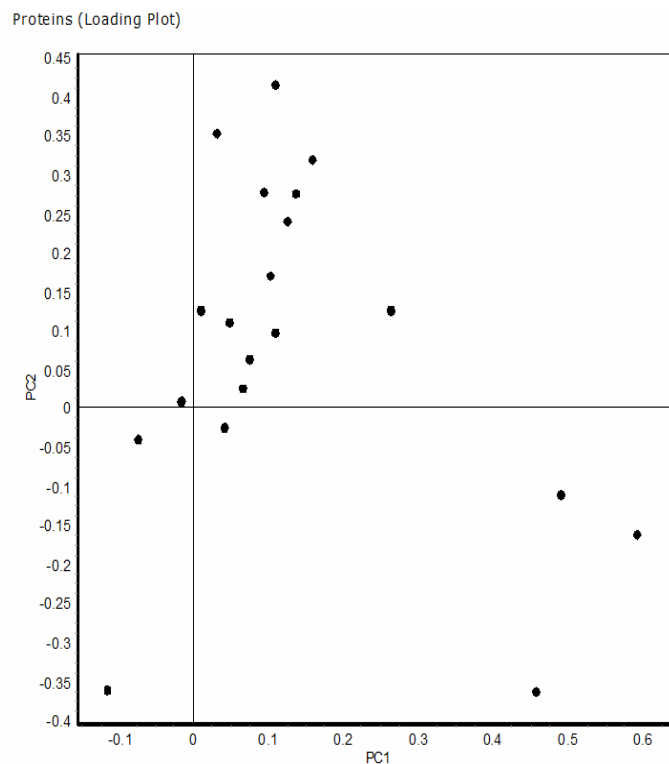
Inicialmente, se llevó a cabo el análisis de la expresión diferencial entre las categorías mencionadas dando como resultado que 20 manchas proteicas resultaron significativas para la comparación entre ratones con afectación frente a no afectación mientras que en la comparación entre ratones WT frente a CD38ko resultaron 9 manchas proteicas con  $P < 0.05$ . Cuando se consideró de forma conjunta la interacción de ambas categorías, 2 manchas proteicas resultaron significativas.

El PCA sobre las 20 manchas proteicas estadísticamente significativas para la comparación entre ratones afectados y no afectados resultó una separación relativamente aceptable para los 4 grupos, resultando de forma más destacada la separación del grupo de ratones WT con afectación positiva respecto al resto (Ver figura 5).

**A**



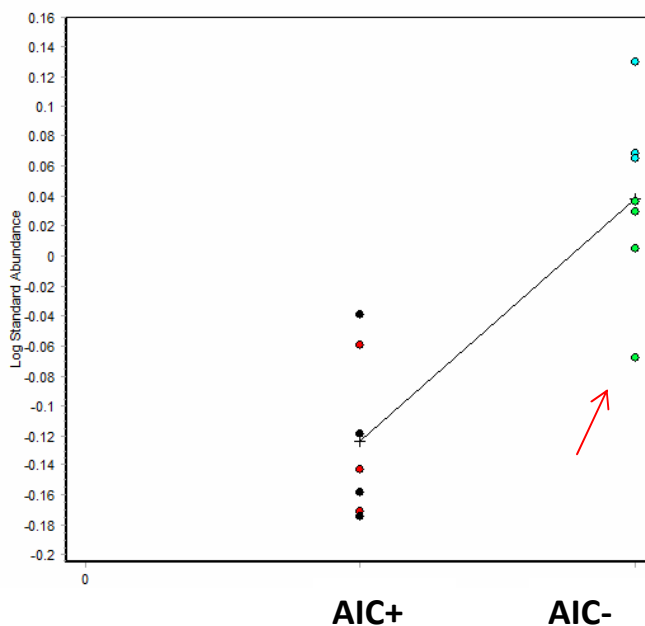
## B



**Figura 5.** Representación del PCA sobre las proteínas expresadas diferencialmente para  $P < 0.05$  para ANOVA de 2-vías entre ratones  $AIC^+$  (WT y  $CD38ko$  afectados de artritis) y ratones  $AIC^-$  (WT y  $CD38ko$  no afectados de artritis). El PCA 1 constituye el 64 % de la variabilidad mientras que el PCA 2 representa el 13.1% de la variabilidad. (A) Distribución de los individuos para cada grupo en función de los PCA 1 y PCA2; se observa cómo el WT nº19 se distribuye en el grupo de los  $CD38ko$  afectados de  $AIC^+$ . (B) Distribución de las proteínas expresadas diferencialmente entre los ratones  $AIC^+$  y ratones  $AIC^-$  en función de los PCA 1 y PCA2

Entre las muestras analizadas destacaba el ratón WT nº19 que a pesar de ser descrito sin afectación clínica, en la distribución representada en la Figura 5 (A) aparece agrupado con los ratones  $CD38ko$  y separado de los ratones WT no afectados teóricamente pertenecientes a su mismo grupo y condición. La comprobación del grado de expresión de ciertas manchas proteicas entre los individuos de los distintos grupos permitió comprobar la distorsión que esta muestra representaba respecto al resto de individuos de su grupo. Como ejemplo, en la Figura 6 aparece la abundancia de la mancha proteica nº361 para cada una de las muestras de los grupos, agrupados en función de si los ratones están afectados o no por la artritis ( $AIC^+$  vs  $AIC^-$ ). Se observa cómo el ratón WT nº19 (flecha roja) presenta una

abundancia discordante con el grupo teórico al que debería pertenecer tal y como ya indicaba el análisis por componentes principales.



**Figura 6.** Abundancia del spot nº361 en los ratones del ensayo agrupados en función de la afectación clínica (AIC+ o AIC-)

Debido a estos hechos, se realizó una revisión del *status* clínico de este individuo. Así, la evaluación radiológica arrojaba un valor de 1, el grado de osteopenia también de 1 y junto con el grado de inflamación de las articulaciones sugerían unos valores más parecidos a los correspondientes a los ratones CD38*ko*, y superiores a ratones no inmunizados o sin afectación clínica. Por tanto, a pesar que la evaluación inicial del estado de la articulación sugería un valor clínico de cero y su inclusión en el grupo de ratones WT no afectados por la artritis, el resto de parámetros sugerían, al menos, una categorización de afectación clínica similar al de los ratones CD38*ko* afectados por la artritis. En función de este descubrimiento gracias al análisis por PCA de las manchas proteicas expresadas diferencialmente entre los ratones afectados y los no afectados por la artritis, se procedió a la inclusión de este ratón WT nº19 dentro de los ratones afectados y al análisis para esta categoría (afectados *versus* no afectados) de las manchas proteicas con diferencias de  $P < 0.05$  para el test estadístico de ANOVA de 2 vías tal y como ha sido descrito de forma previa (Figura 3). El resto de los análisis una vez modificada la inclusión de la muestra del ratón WT nº19 al grupo de los ratones afectados se comentan a continuación.

Por otro lado, cuando los ratones se agruparon en función de la categoría de si eran WT o CD38*ko* sin considerar el grado de afectación de la artritis, 7 manchas

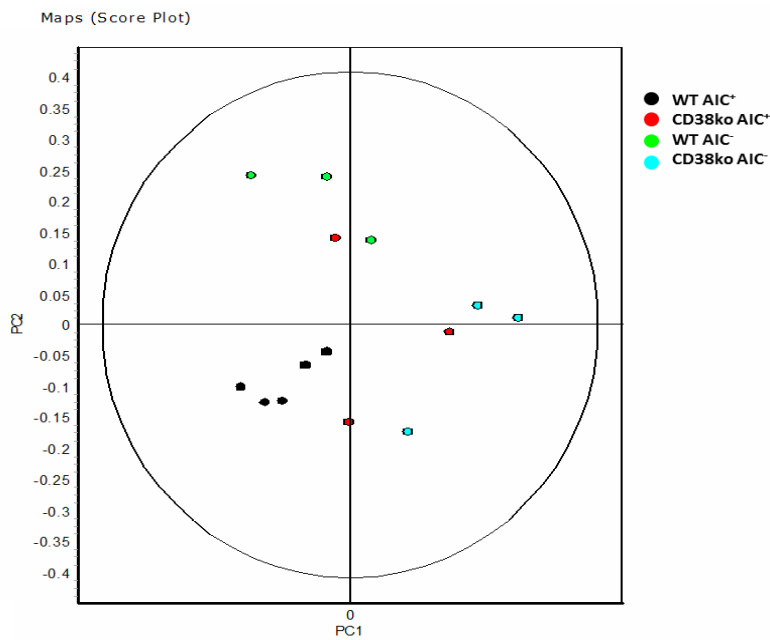
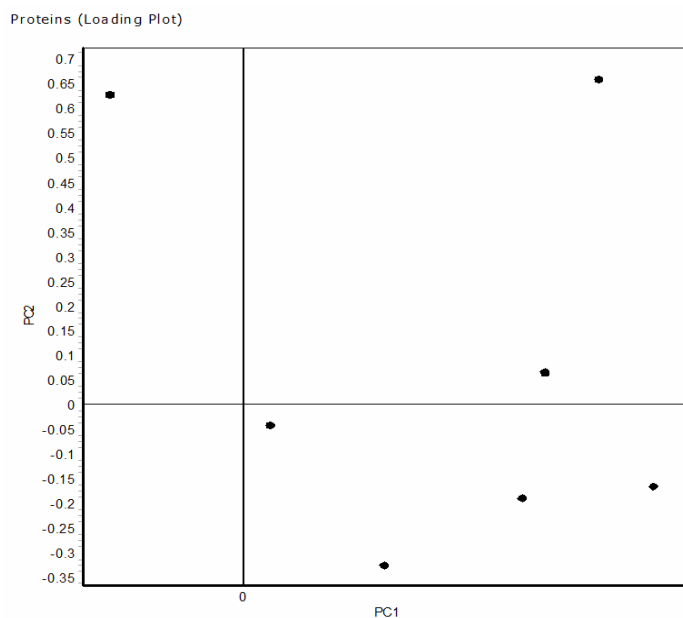


proteicas resultaron estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ) para ANOVA 2-vías (tabla 4).

**Tabla 4. Proteínas sobreexpresadas en el suero de ratones WT y CD38ko con valores de  $P < 0.05$  para ANOVA de 2 vías**

<b>B6 WT</b>				
<b>código</b>	<b>Identificación</b>	<i>P value</i> según afectación clínica	<i>P value</i> según <b>tipo Ratón</b>	interacción 2 categorías
362	cadena kappa Ig, C region	0,182	0.0449	0,189
<b>CD38ko</b>				
<b>código</b>	<b>Identificación</b>	<i>P value</i> según afectación clínica	<i>P value</i> según <b>tipo Ratón</b>	interacción 2 condiciones
503	Complemento C1q, subunidad B	0.521	6.06E-03	0.018
498	Ig dominio kappa	0.0983	0.014	0.141
	Fosfatidil-glican-específica			
499	Fosfolipasa D	0.387	0.0167	0.408
502	Ig kappa chain V-II región 26-10	0.69	0.0331	0.304
305	Apo E	0.0373	0.0365	0.0489
404	Major urinary protein 20	7.82E-0.3	0.0381	0.07

En este caso, ni mediante el PCA (Figura 7) sobre las 7 manchas proteicas ni la representación jerarquizada mediante dendograma permiten adivinar una distribución aceptable acorde con los grupos de ratones B6 WT y CD38ko que se comparaban. Sin embargo, sí parece que son los ratones WT afectados de artritis los que representan un grupo más homogéneo apareciendo en la representación del PCA en cierta manera diferenciados respecto a los WT sin artritis (sobre los que debería presentar cierta similitud según la distribución en grupos realizada), y respecto al resto de grupos de los ratones CD38ko.

**A****B**

**Figura 7.** Representación del PCA sobre las proteínas expresadas diferencialmente para  $P < 0.05$  para ANOVA de 2-vías entre ratones B6 WT y ratones CD38ko. El PCA 1 constituye el 53% de la variabilidad mientras que el PCA 2 representa el 20.9 % de la variabilidad (A) Distribución de los individuos para cada grupo en función de los PCA 1 y PCA 2. (B) Distribución de las proteínas expresadas diferencialmente entre ratones B6 WT y ratones CD38ko. en función de los PCA 1 y PCA2

Cuando se consideraron las dos categorías antes estudiadas (entre ratones AIC<sup>+</sup> y AIC<sup>-</sup> y entre ratones WT y CD38ko) en la interacción o implicación conjunta en el desarrollo de la artritis, 7 manchas proteicas eran estadísticamente significativas con

$p < 0.05$  para ANOVA 2-vías, de las cuales, 3 fueron identificadas como Complemento C1q subunidad B (nº 503), Complemento C4-B (nº 365) y Apo-E (nº 305).

**Tabla 5. Proteínas con valores de  $p < 0.05$  para ANOVA de 2 vías en la interacción de las dos categorías para la comparación entre ratones AIC<sup>+</sup> y AIC<sup>-</sup> y entre ratones WT y CD38ko**

código	Identificación	<i>P value</i> según afectación clínica	<i>P value</i> según tipo Ratón	interacción 2 categorías
506	no identificada	0.167	0.065	0.0157
503	Complemento C1q, subunidad B	0.521	6.06E-03	0.018
296	no identificada	8.18E-04	0.131	0.0226
405	no identificada	2.88E-03	0.204	0.0369
336	no identificada	0.0473	0.292	0.0388
365	Complemento C4-B	0.25	0.508	0.0422
292	no identificada	8.28E-03	0.38	0.0451
305	Apo-E	0.0373	0.0365	0.0489

El PCA sobre estas 7 manchas proteicas estadísticamente significativas no consigue una distribución diferencial entre los 4 grupos en estudio aunque como sucede para la comparación entre los ratones B6 WT y CD38ko sin considerar la afectación clínica, es el grupo de los ratones B6 WT afectados de artritis el que se distribuye de forma más homogénea y de forma separada al resto de los otros tres grupos de ratones considerados.

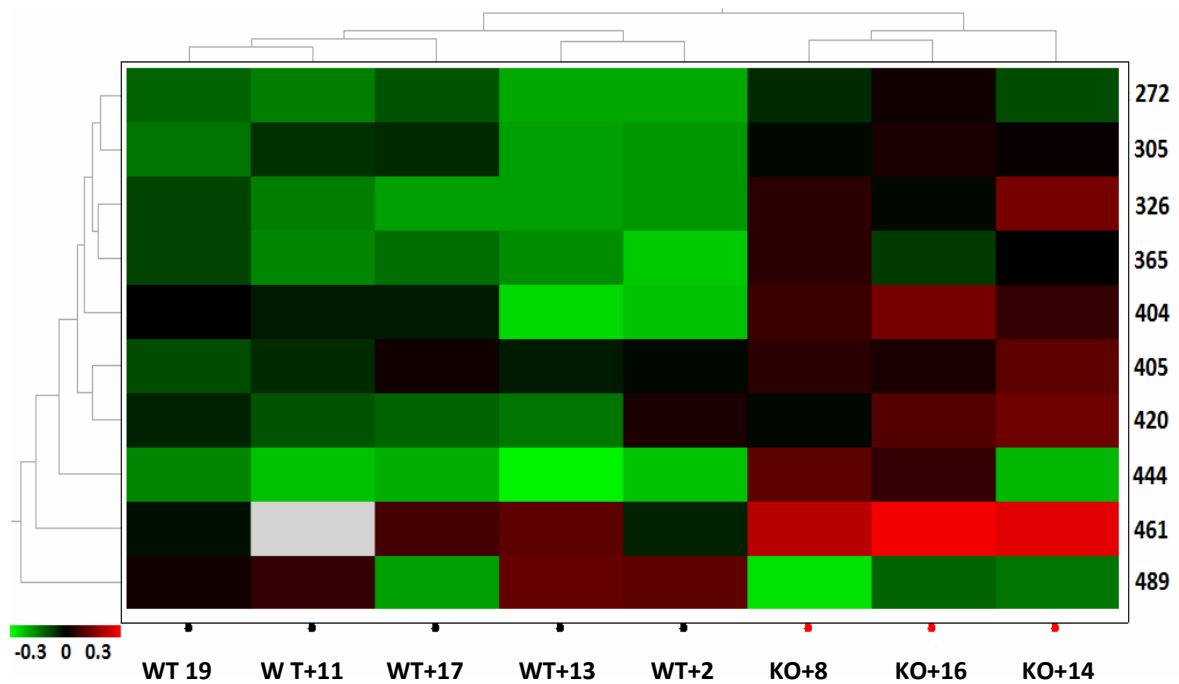
Para intentar establecer las diferencias entre el perfil de expresión de proteínas en suero entre ratones B6 WT y ratones CD38ko verdaderamente afectados de artritis, sin la interferencia de los ratones que no tuvieran síntomas de padecer artritis o esta fuera muy benigna, se determinaron qué proteínas pudieran presentar una expresión diferencial entre estos dos grupos y si éstas permitían clasificar de forma inequívoca a los ratones como B6 WT o CD38ko. Para ello se calculó para cada proteína la media de la ratio resultante de dividir la abundancia de cada proteína en CD38ko respecto a la abundancia en B6 WT, considerándose los ratones B6 WT como grupo control y los CD38ko como grupo test o prueba. Los valores negativos de dicha ratio indican menor expresión de las proteínas correspondientes en el grupo de ratones CD38ko respecto al grupo B6 WT, mientras que los positivos indican un incremento en la expresión en los CD38ko respecto a los B6 WT.

Diez manchas proteicas resultaron con expresión diferencial entre los ratones B6 WT afectados de artritis (grupo control) y CD38ko (grupo test) afectados de artritis (Tabla X). De todas ellas, 9 proteínas estaban incrementadas en los ratones CD38ko AIC<sup>+</sup>, de las que 3 se corresponden con Apo E, 1 mancha proteica para Complemento C4-B, 1 para MUP20 y otra para la Beta-2 microglobulina. Un único spot que no pudo ser identificado estaba incrementado en el grupo de ratones B6 WT afectado frente a los CD38ko.

**Tabla 6. Proteínas expresadas diferencialmente en el suero de ratones CD38ko con artritis respecto a ratones WT con artritis para t-test <0.05**

<b>Disminuidas</b>			
<b>código</b>	<b>Identificación</b>	<b>t-test</b> P<0.05	<b>Average</b> <b>ratio</b>
420	no identificada	0.0477	-1.62
<b>Aumentadas</b>			
<b>código</b>	<b>Identificación</b>	<b>t-test</b> P<0.05	<b>Average</b> <b>Ratio</b>
404	Major urinary protein 20	2.11E-03	+1.66
489	Apo E	5.03E-03	+1.69
444	Beta 2 microglobulina	0.0139	+1.41
326	Apo E	0.0153	+1.34
305	Apo E	0.0166	+1.25
272	No identificada	0.018	+1.3
365	Complemento C4-B	0.0275	+1.4
405	No identificada	0.0397	+1.68
461	No identificada	0.0384	+1.54

A partir de estas proteínas con expresión diferencial se realizó el análisis de tipo multivariante con el objetivo de determinar si estas diferencias podían servir para clasificar los individuos en estudio. La representación jerarquizada mediante dendograma permite observar cómo los individuos son clasificados y separados a partir del primer nodo de separación en los dos grupos preestablecidos. Es posible también determinar las diferencias de expresión relativas entre las distintas proteínas entre los dos grupos (Figura 8). El cálculo del PCA sobre estas 7 proteínas con expresión diferencial también permitía separar entre los dos grupos en función del PCA 1 de forma similar a lo observado con la representación del dendograma.

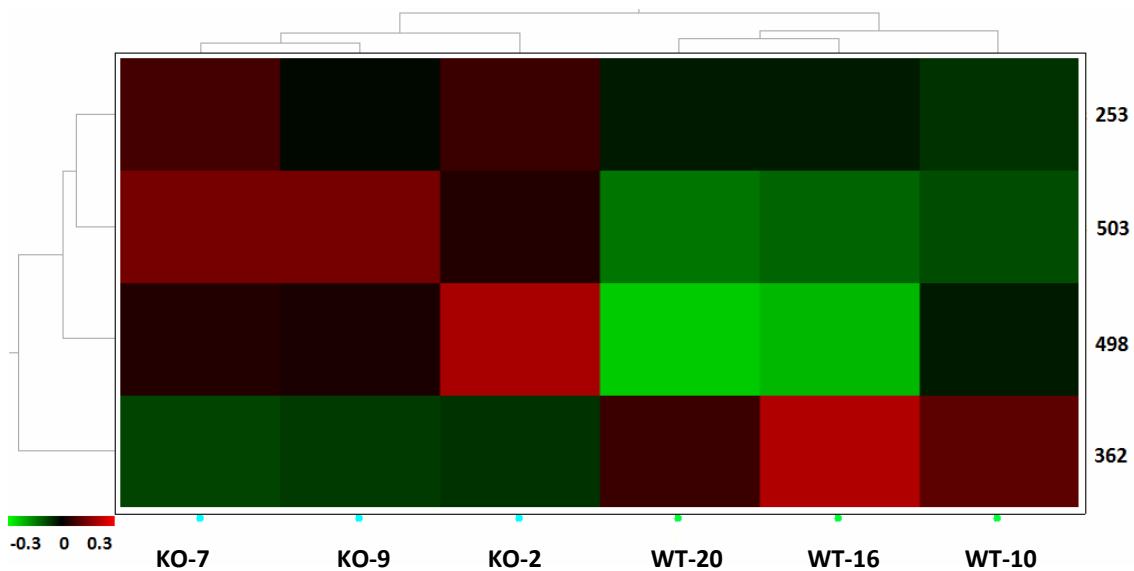


**Figura 8.** Representación en dendrograma de las proteínas expresadas diferencialmente para  $P < 0.05$  para t-test entre ratones ratones B6 WT afectados de artritis (grupo control) y CD38ko afectados de artritis (grupo test)

De forma similar al análisis anterior, se estudió si existían diferencias de expresión en los ratones B6 WT y Cd38ko sin afectación clínica de artritis. 4 manchas proteicas resultaban significativas para  $P < 0.05$  aplicando el t-test, de las que una se encontraba sobreexpresada en el grupo WT AIC- mientras que las 3 restantes estaban sobreexpresadas en el grupo de CD38ko AIC- (Tabla 9). Aun siendo sólo 4 las proteínas expresadas diferencialmente entre estos grupos, el análisis multivariante para la clasificación jerarquizada mediante dendrograma permitió diferenciar los ratones pertenecientes a estos grupos (Figura 8).

**Tabla 8. Proteínas expresadas diferencialmente en el suero de ratones CD38ko no afectados de artritis respecto a ratones WT sin artritis para t-test <0.05**

Disminuidas			
código	Identificación	t-test P<0.05	Average ratio
362	cadena kappa Ig, C region	8.24E-03	-1.59
Aumentadas			
código	Identificación	t-test P<0.05	Average Ratio
253	Factor Coagulación V	0.0395	+1.23
498	Ig dominio kappa	0.0396	+1.8
503	Complemento C1q, subunidad B	4.22E-03	+1.68

**Figura 9. Representación en dendrograma de las proteínas expresadas diferencialmente para P<0.05 para t-test entre ratones ratones B6 WT y CD38ko no afectados de artritis**

## 5. Análisis proteómico del suero de ratones en un modelo de inflamación

La inmunización de los ratones con COL II se realiza preparando una emulsión de este colágeno con CFA el cual, está constituido por un extracto de la *Mycobacterium tuberculosis* y aceite mineral que ya de por sí pueden ambos inducir en ratones normales una respuesta inflamatoria muy potente [9]. Además, se ha descrito que el CFA puede actuar induciendo y potenciando las respuestas inmunológicas innata y

adaptativa [10]. Así, nos propusimos evaluar si las diferencias de expresión observadas previamente en ciertas proteínas entre ratones WT y CD38*ko* inmunizados con COL II se debían a una respuesta inmunológica específica contra el colágeno o eran consecuencia directa de la respuesta inflamatoria contra el adyuvante empleado (CFA).

Para aclarar esta cuestión, se realizó un análisis proteómico de expresión diferencial 2D-DIGE sobre el suero de 4 ratones WT y 4 ratones CD38*ko* a la 6ª semana desde la primera inyección de CFA. Inicialmente, los ratones fueron inyectados con CFA/PBS y a los 14 días con IFA/PBS siguiendo el mismo protocolo de inmunización con Col II de pollo pero sin emplearlo en ninguna de las dos inyecciones. Además, como en la segunda inyección no se emplea el extracto bacteriano no es previsible la aparición de anticuerpos anti-proteínas bacterianas de la clase IgG, es decir, no se trata en ningún caso de protocolo de inmunización sino de provocar una respuesta inflamatoria similar a la que acompaña a la inmunización propiamente dicha con Colágeno tipo II de pollo. De hecho, ninguno de los ratones tratados de esta manera presentaban signos clínicos de artritis (datos no presentados). En cualquier caso, en comparación con otros modelos de inflamación aguda (referencias), el protocolo utilizado (CFA/IFA) se puede considerar como un modelo de inflamación prolongado en el tiempo (inflamación crónica). Como queda reflejado en la tabla 9, 6 manchas proteicas aparecen incrementadas en los ratones Cd38*ko* tratados con CFA/IFA en comparación con los WT tratados de la misma forma. De estas 6 manchas proteicas, una de ellas se identificó como Proteína Sérica Amiloide A1, dos de ellas como Beta 2 microglobulina (nº444 y nº450), otra mancha proteica fue identificada como Complemento C4-B, mientras que la restante fue identificada como Apo A-II.

Por el contrario, 12 manchas proteicas aparecen disminuidas en los ratones CD38*ko* inyectados con CFA/IFA en comparación con los WT tratados con CFA/IFA. Tres de estas manchas proteicas fueron identificadas como la cadena kappa de Ig, Las proteínas Complemento C4-B, Ficolina-1 y Antitrombina-III estaban representadas por 2 manchas proteicas para cada caso, mientras que las proteínas Apo-E y Clusterina estaban representadas por 1 mancha proteica para cada caso.

**Tabla 9. Proteínas expresadas diferencialmente en el suero de ratones CD38ko respecto a ratones WT en un modelo de inflamación crónica (CFA/IFA)**

<b>Disminuidas en CD38ko respecto a WT</b>			
<b>código</b>	<b>Identificación</b>	<b>valor t-test</b>	<b>av.ratio</b>
369	cadena kappa Ig, C region	6,81E-03	-1,44
362	cadena kappa Ig, C region	0,0123	-1,35
489	Apo-E	0,0181	-1,34
520	Antitrombina-III	0,0182	-1,44
365	Complemento C4-B	0,0221	-1,25
176	Complemento C4-B	0,0246	-1,50
175	Antitrombina-III	0,0291	-1,49
269	Ficolina-1	0,0375	-1,28
278	no identificada	0,0419	-1,28
324	Clusterina	0,0439	-1,28
502	Ig G kappa chain C region 26-10	0,0464	-1,82
294	Ficolina-1	0,0498	-1,45
<b>Aumentadas en CD38ko respecto a WT</b>			
<b>código</b>	<b>Identificación</b>	<b>valor t-test</b>	<b>av.ratio</b>
472	Apo A-II	0,0234	+1,35
450	Beta 2 microglubulina	0,0335	+1,41
309	Complemento C4-B	0,0372	+1,44
444	Beta 2 microglubulina	0,0418	+1,38
452	Proteína Sérica Amiloide A1	0,0423	+3,07
319	no identificada	0,048	+1,30

La mayoría de las proteínas expresadas diferencialmente pueden agruparse en tres categorías: (i) proteínas de fase aguda, (ii) factores del complemento o proteínas relacionadas, (iii) apolipoproteínas; lo que sugiere diferencias entre los ratones CD38ko y WT en la respuesta inflamatoria ante el tratamiento con CFA/IFA. Algunas de las proteínas identificadas coinciden con las proteínas con expresión diferencial identificadas en los ratones inmunizados con Col-II. Aun así, un análisis exhaustivo de algunas manchas proteicas refleja que, a pesar de tratarse de la misma proteína, aparecen representadas de forma única en los ratones WT o CD38ko inmunizados con CFA/IFA.

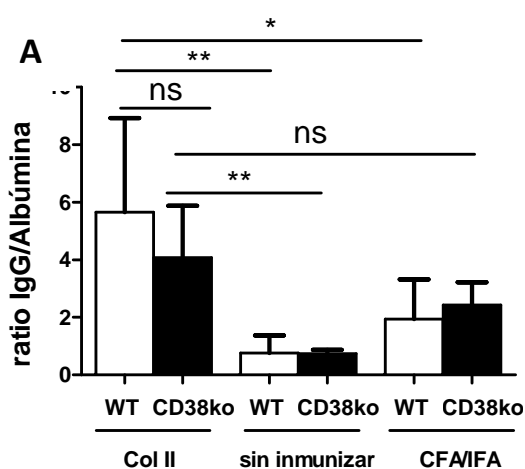


## 6. Análisis proteómico del suero de ratones sin inmunizar

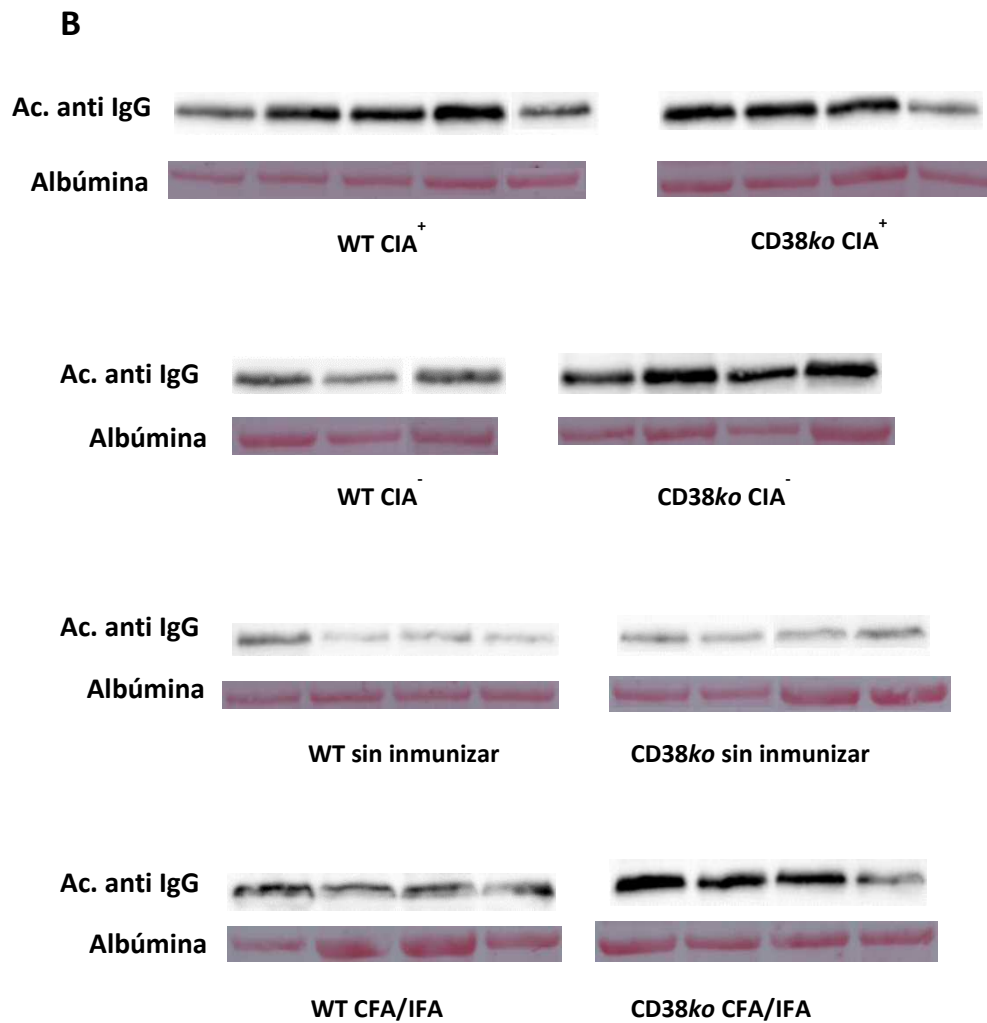
Para conocer si basalmente había diferencias intrínsecas en el proteoma sérico de los ratones CD38ko y WT, se realizó un análisis proteómico de expresión diferencial 2D-DIGE sobre el suero de 4 ratones WT y 4 ratones CD38ko sin inmunizar. No se observaron diferencias entre los patrones de expresión de los ratones no inmunizados WT en comparación con los ratones no inmunizados CD38ko, más allá de una única mancha proteica (*Average ratio* = 1.48, *P* = 0.0348) correspondiente al nº 509 e identificada como Albúmina Sérica (Anexo II, tabla con las proteínas identificadas mediante MS).

## 7. Western Blot

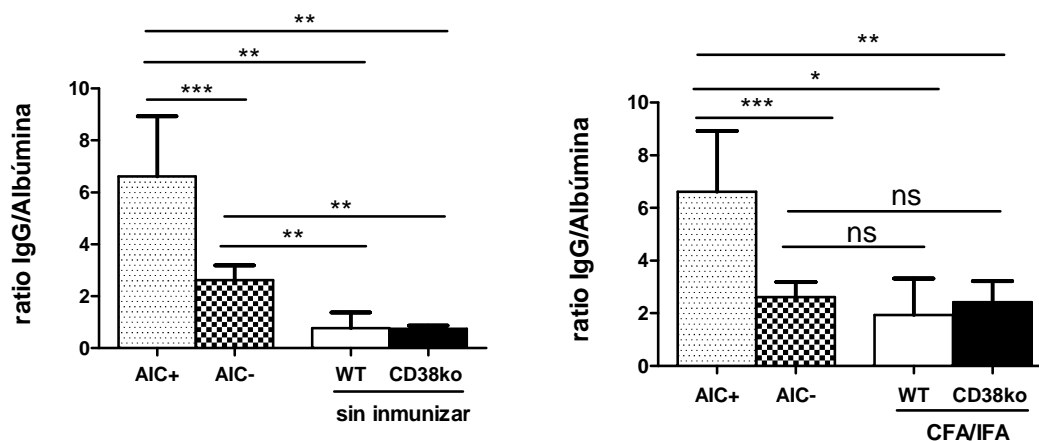
Mediante *Western Blot* con anticuerpos específicos se validaron algunas proteínas que presentaban expresión diferencial entre las distintas comparaciones realizadas mediante el análisis proteómico por 2D-DIGE. Una de las proteínas comprobadas fue la proteína IgG que fue identificada en varias manchas proteicas distintas y como varias subunidades distintas de la misma proteína. Una vez realizada la densitometría de las bandas detectadas, la comparación entre los ratones B6 WT y CD38ko no arrojaba ninguna diferencia significativa aunque sí se observó un aumento en la cantidad de esta proteína en los ratones inmunizados con Col. II ya sean WT o CD38ko en comparación con los respectivos ratones no inmunizados no inmunizados de la misma estirpe. Además, en el caso de los ratones WT presentaban una diferencia significativa respecto a los ratones WT inmunizados con CFA/IFA (ver Figura 10).



**Figura 10.** Valores de densitometría de las bandas identificadas para IgG por Western Blot una vez corregidas respecto a la cantidad de albúmina del respectivo carril. (A) Comparación de los ratones inmunizados con Col II agrupados según sean WT o CD38ko con ratones sin inmunizar y ratones inmunizados con CFA/IFA. (B) Imagen de las bandas correspondientes para IgG de las muestras para cada grupo



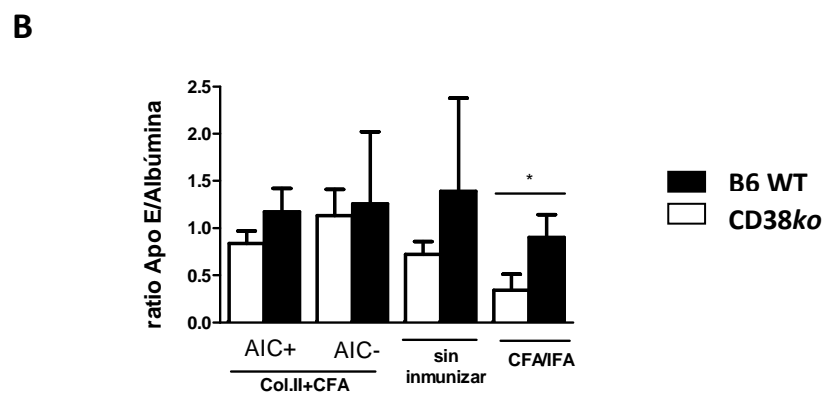
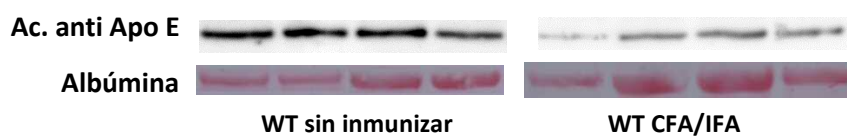
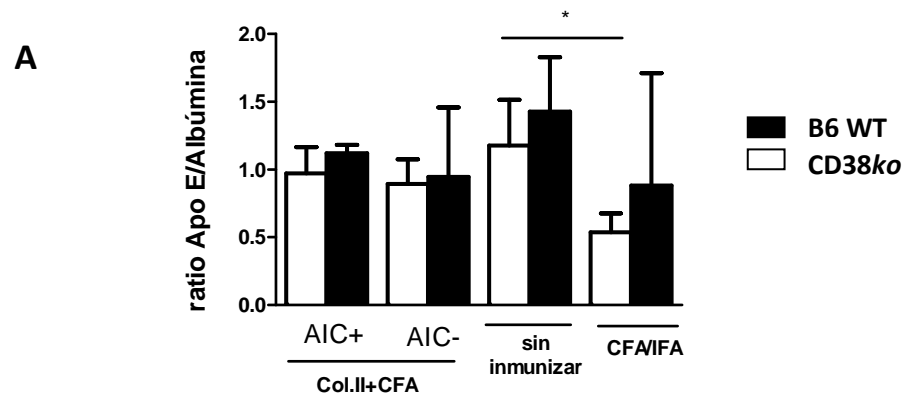
Por otro lado, la comprobación de los niveles de IgG por WB en función de si los ratones están afectados o no por la artritis permite observar la mayor cantidad de IgG en los ratones AIC+ respecto a los AIC- (Figura 11). Además, la comparación de estos ratones inmunizados con Col. II respecto a los ratones sin inmunizar permite observar cómo los ratones que desarrollan la artritis presentan diferencias significativas para esta proteína respecto a los ratones no inmunizados. Respecto a los ratones inmunizados con CFA/IFA respecto a los inmunizados con Col.II (AIC+ o AIC-), se observa cómo en los ratones que no desarrollan artritis los niveles son muy parecidos a los ratones CD38ko inmunizados con CFA/IFA mientras que en los WT sí se observa un aumento significativo de la IgG en comparación con los WT inmunizados con CFA/IFA.

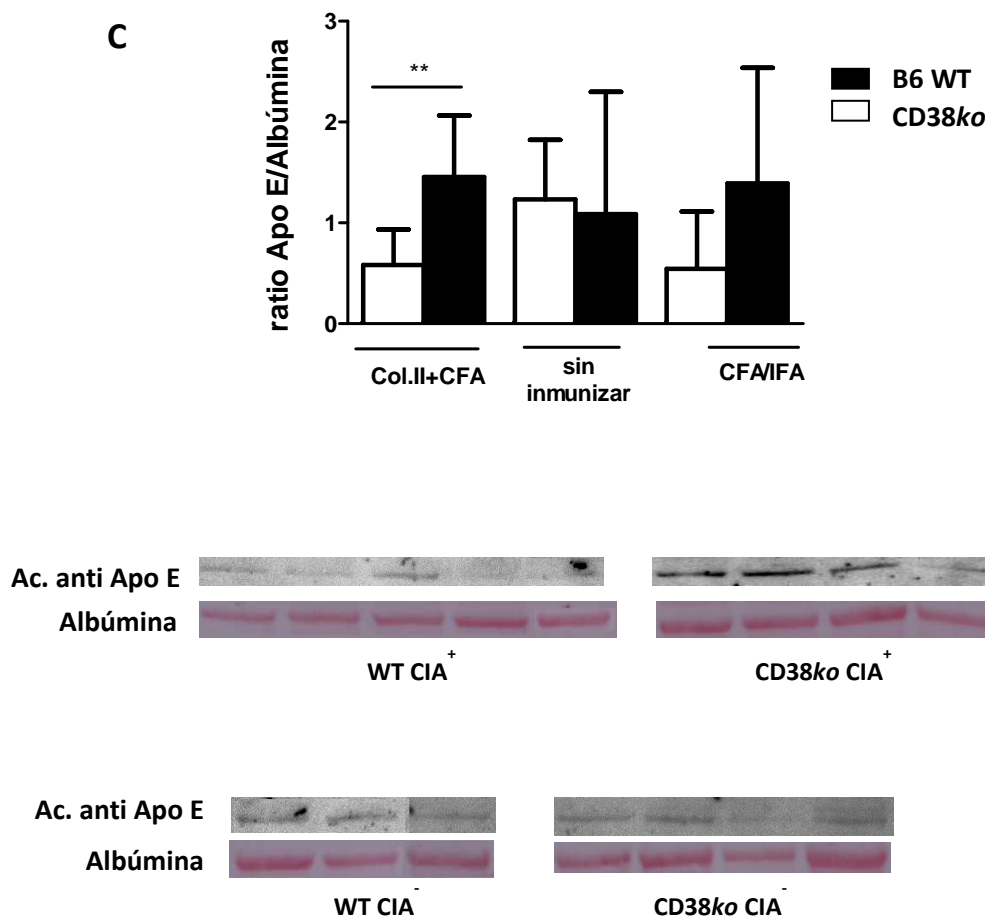


**Figura 11.** Valores de densitometría de las bandas identificadas para IgG por Western Blot una vez corregidas respecto a la cantidad de albúmina del respectivo carril. Comparación de los ratones inmunizados con Col II agrupados según resulten afectados o no por la artritis (AIC+ y AIC-, respectivamente) con ratones sin inmunizar y ratones inmunizados con CFA/IFA

La proteína Apo-E también fue considerada de interés para validar las diferencias encontradas en los estudios de proteómica diferencial. La detección de Apo E con el anticuerpo específico dio lugar a distintas bandas con diferentes Pm aparentes lo que podría corresponderse con las distintas manchas proteicas obtenidas con esta identificación en los geles 2-D. Tres bandas correspondientes a Apo E fueron detectadas, una mayoritaria de aproximadamente 35 kDa, una intermedia en posición e intensidad de ~50 kDa y una superior más tenue que las anteriores con ~75 kDa. Para cada una de las bandas se realizó la densitometría y las comparaciones entre los grupos de forma similar al caso anterior. Para la banda inferior y mayoritaria, ninguna de las comparaciones realizadas arrojaba diferencia alguna ya fuese comparando con los ratones inmunizados con Col.II y siendo agrupados en función de la afectación clínica (AIC+ vs AIC-) o en función de si los ratones eran B6WT o CD38ko (Figura 12-A). Sí se apreciaba una mayor cantidad de la proteína Apo E en los ratones no inmunizados respecto a los inmunizados ya fuese con Col. II o con CF/IFA. Respecto a la banda intermedia, entre los ratones inmunizados con Col. II no se aprecian diferencias entre los ratones en función de su grado de afectación o la estirpe de ratón y sólo se parecían diferencias entre los ratones B6 WT y CD38ko inmunizados con CFA/IFA (Figura 12-B). Por último, para la banda superior que era la más tenue de las tres detectada para Apo E, se observaba una diferencia significativa entre los ratones CD38ko en comparación con los B6 WT, siendo ambos grupos inmunizados con Col.II+CFA (Figura 12-C) Mediante las imágenes de la banda de Apo E para cada

grupo se observa cómo son los CD38ko afectados de artritis (AIC<sup>+</sup>) los que presentan los valores más altos de esta proteína respecto a los restantes grupos y contribuyen a que la diferencia, cuando se consideran los CD38ko en conjunto sin atender a la afectación, resulte significativa respecto a los WT .

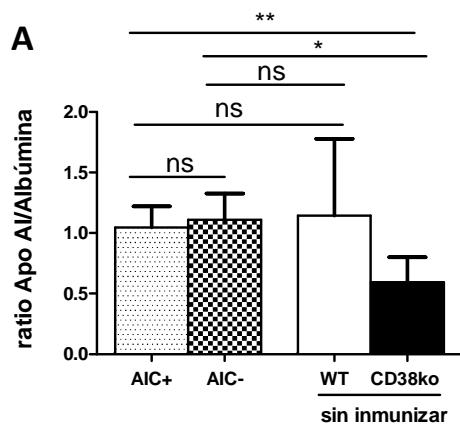




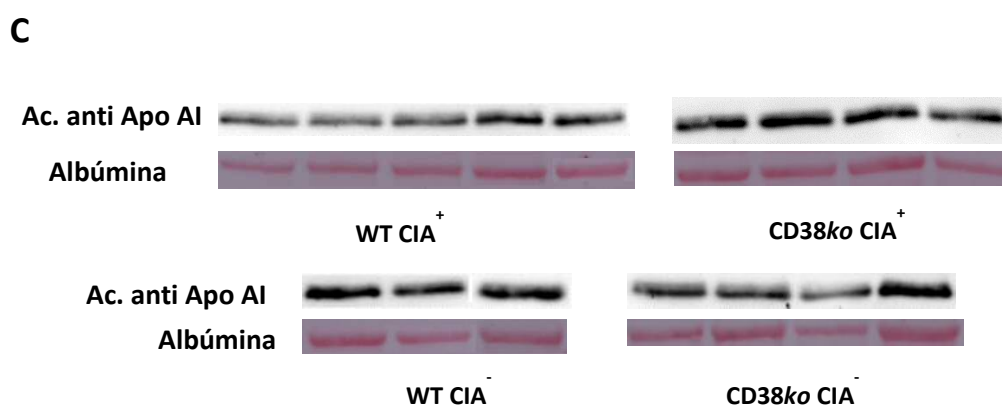
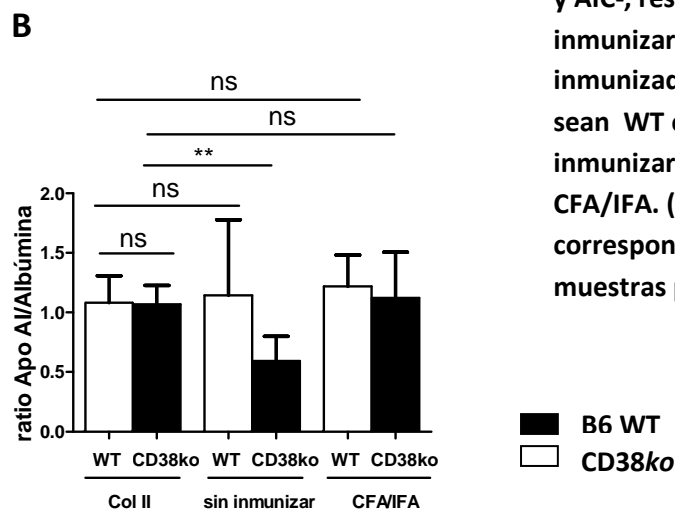
**Figura 12.** (A) Valores de densitometría de la banda mayoritaria para ApoE (~35kDa) e imagen de la banda detectada para los ratones WT sin inmunizar y WT tratados con CFA/IFA. (B) Valores de densitometría de la banda intermedia para ApoE (~50kDa) e imagen de la banda detectada para los ratones WT y CD38ko tratados con CFA/IFA. (C) Valores de densitometría de la banda superior para ApoE (~75kDa) e imagen de la banda detectada para los ratones WT y CD38ko inmunizados con Col.II+CFA

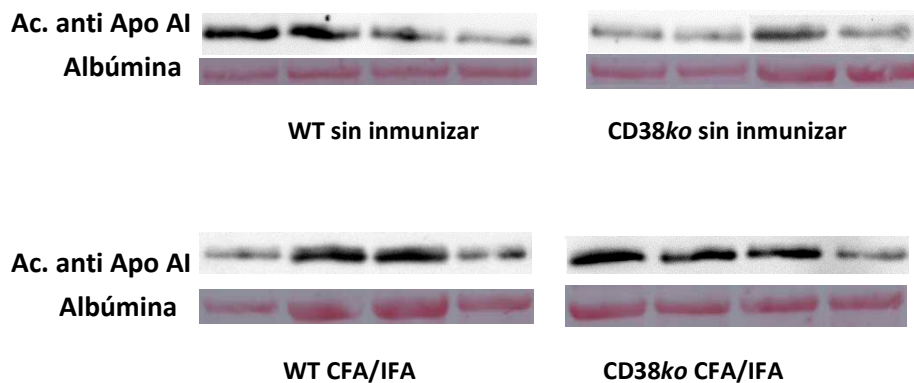
Mediante WB también se intentaron confirmar las diferencias de expresión de la proteína Apo AI que resultaba incrementada en los ratones AIC- en comparación con los AIC+ (Tabla 3) en cinco manchas proteicas distintas. En la detección de la proteína por el anticuerpo específico sólo resultó identificable una banda que se correspondía con el Pm aproximado de la proteína acorde con las manchas proteicas mayoritarias, nº 361 y nº 379. Realizada la densitometría, a diferencia del análisis proteómico no se observaron diferencias entre los ratones AIC+ y AIC- aunque sí de estos grupos en comparación con los ratones CD38ko sin inmunizar (Figura 12). Además, agrupando los ratones inmunizados con Col. II en función de si eran WT o CD38ko y comparando los valores de Apo AI con los de los ratones sin inmunizar e

inmunizados con CFA/IFA, destaca cómo en los ratones Cd38ko la inmunización con Col II o con CFA/IFA eleva los valores de esta proteína en comparación con los ratones sin inmunizar, resultando una diferencia significativa entre los CD38ko +Col II respecto a los CD38ko sin inmunizar (Figura 13).



**Figura 13.** Valores de densitometría de las bandas identificadas para Apo A1 por Western Blot una vez corregidas respecto a la cantidad de albúmina del respectivo carril. (A) Comparación de los ratones inmunizados con Col II agrupados según resulten afectados o no por la artritis (AIC+ y AIC-, respectivamente) con ratones sin inmunizar. (B) Comparación de los ratones inmunizados con Col II agrupados según sean WT o CD38ko con ratones sin inmunizar y ratones inmunizados con CFA/IFA. (C) Imagen de las bandas correspondientes para Apo A1 de las muestras para cada grupo

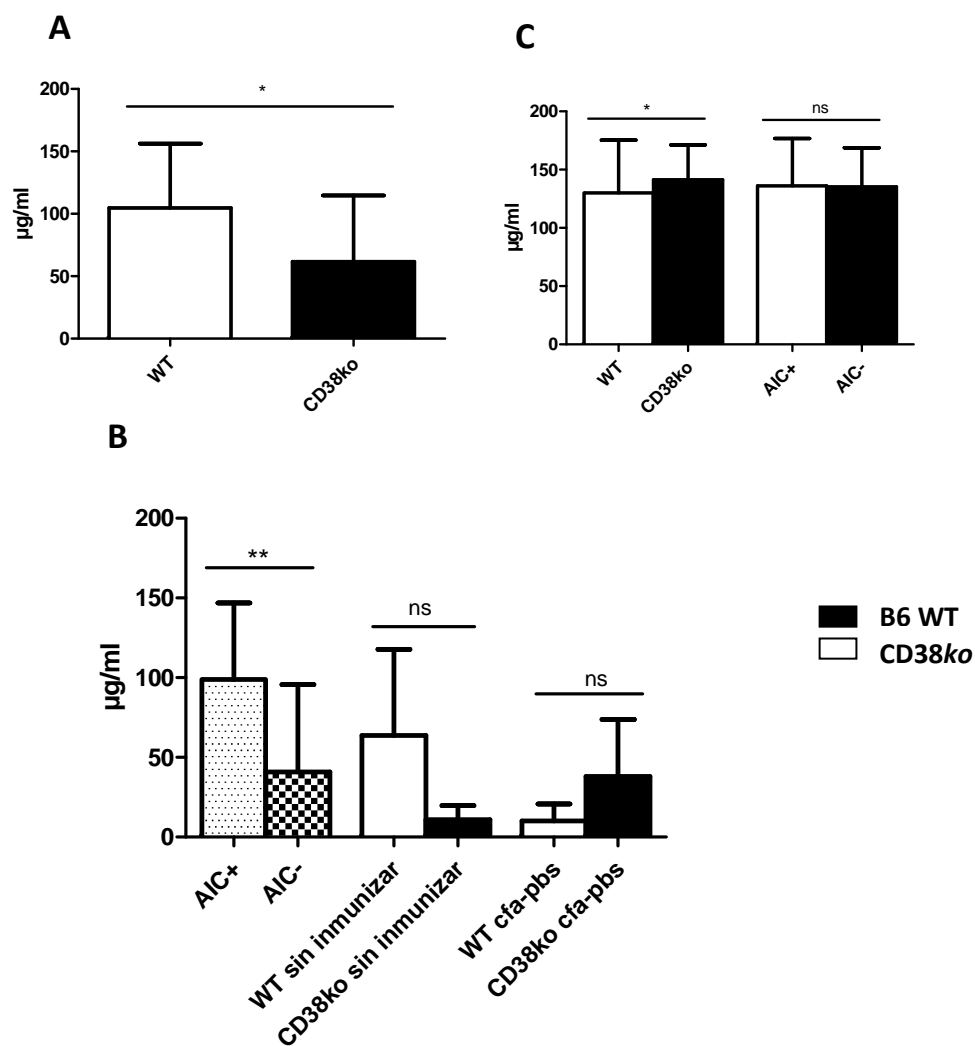




## 8. ELISA

Varias proteínas se cuantificaron por ELISA para confirmar por un método alternativo las diferencias de expresión proteica observadas en los experimentos 2D-DIGE anteriormente descritos. Las muestras de suero utilizadas para los ensayos de ELISA se emplearon sin fraccionar y con las diluciones correspondientes recomendadas por el fabricante. En todos los casos se emplearon las mismas muestras de suero sobre las que se realizaron los experimentos de 2D-DIGE y se incorporaron muestras adicionales de suero de ratones inmunizados con CFA+Col- II para cada grupo (WT y CD38ko) procedentes del mismo experimento o bien de otros experimentos realizados en paralelo. En el resto de los casos (ratones sin inmunizar o ratones tratados con CFA/IFA) la cuantificación por ELISA se realizó en alícuotas procedentes de los mismos sueros de los ratones en los que se había hecho el análisis de expresión diferencial.

La proteína SAA, se consideró de interés para la su determinación mediante ELISA ya que se trata de una proteína de fase aguda que aparece incrementada en el suero de los ratones CD38ko respecto al suero de los ratones B6 WT en el modelo de inflamación crónica con CFA/IFA, y podría también resultar como elemento diferencial en los ratones inmunizados con Col II. Tras la 6ª semana desde la 1ª inmunización se observa que los niveles detectados en el suero de ratones B6 WT inmunizados con COL II+ CFA son estadísticamente significativos en comparación con los niveles detectados en ratones CD38ko inmunizados con Col-II+ CFA (Figura 14-A).



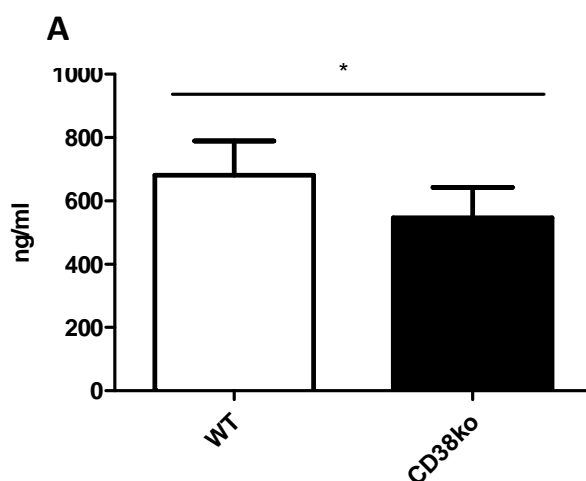
**Figura 14.** Valores de SAA medidos por ELISA. (A) Ratones WT y CD38ko a la semana 6ª desde la primera inmunización. (B) Ratones AIC+ y AIC-, ratones WT y CD38ko sin inmunizar y ratones WT y CD38ko inmunizados con CFA/IFA a la semana 6ª desde la primera inmunización. (C) Ratones WT y CD38ko a la semana 3ª desde la primera inmunización

Además, cuando las muestras se agrupan en función de si los ratones están afectados o no por la AIC y se comparan con ratones inmunizados con CFA/IFA y ratones no inmunizados, se observa que en los ratones afectados por AIC los niveles de SAA detectados son muy superiores a los otros tres grupos (Figura 14-B). Tal y como sucedía en el análisis proteómico mediante 2D-DIGE, los niveles de SAA aparecen aumentados en los ratones CD38ko frente a los B6 WT, inmunizados ambos grupos con CFA/IFA, aunque en este caso la diferencia no resulta estadísticamente significativa. También, resulta destacable que cuando se miden los niveles de SAA a

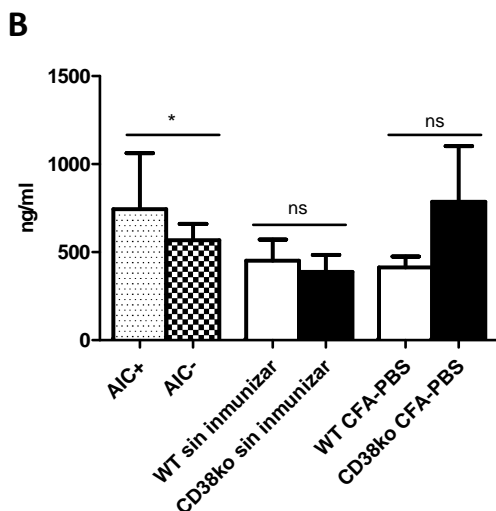


las tres semanas tras la 1ª inmunización, si se agrupan los datos en función del tipo de ratón (WT o CD38ko) aparecen aumentados los niveles de SAA en los ratones CD38ko frente a los WT, mientras que si se agrupan en función de si están afectados o no por la AIC no hay diferencias significativas entre ellos (Figura 14-C). Así, tras lo observado en los apartados A y B en la Figura 14 correspondiente a la semana 6ª y los resultados a la semana 3ª, parece indicar que los valores de SAA a la semana 6ª se mantienen altos para los ratones que resultan afectados por la AIC+ y para los ratones WT, que en su mayoría desarrollan AIC, reflejando el componente inflamatorio de la afección artrítica, mientras que las diferencias observadas a la semana 3ª podrían ser indicativas de la acción de la inmunización con CFA/IFA y no reflejar de forma directa el proceso artrítico ya que a tiempo final (semana 6ª) los ratones CD38ko presentan menor afectación que los ratones WT.

Para la proteína Ficolina-1, a la 6ª semana desde la 1ª inmunización se observan niveles detectados superiores de esta proteína en el suero de ratones B6 WT inmunizados con COL II+ CFA en comparación con los niveles detectados en ratones CD38ko inmunizados con COL II+ CFA (Figura 15-A). Además, cuando las muestras se agrupan en función de si los ratones están afectados o no por la AIC y se comparan con ratones tratados con CFA/IFA y ratones no inmunizados, se observa que en los ratones afectados por AIC los niveles de Ficolina-1 detectados son muy superiores a los otros tres grupos (Figura 15-B)



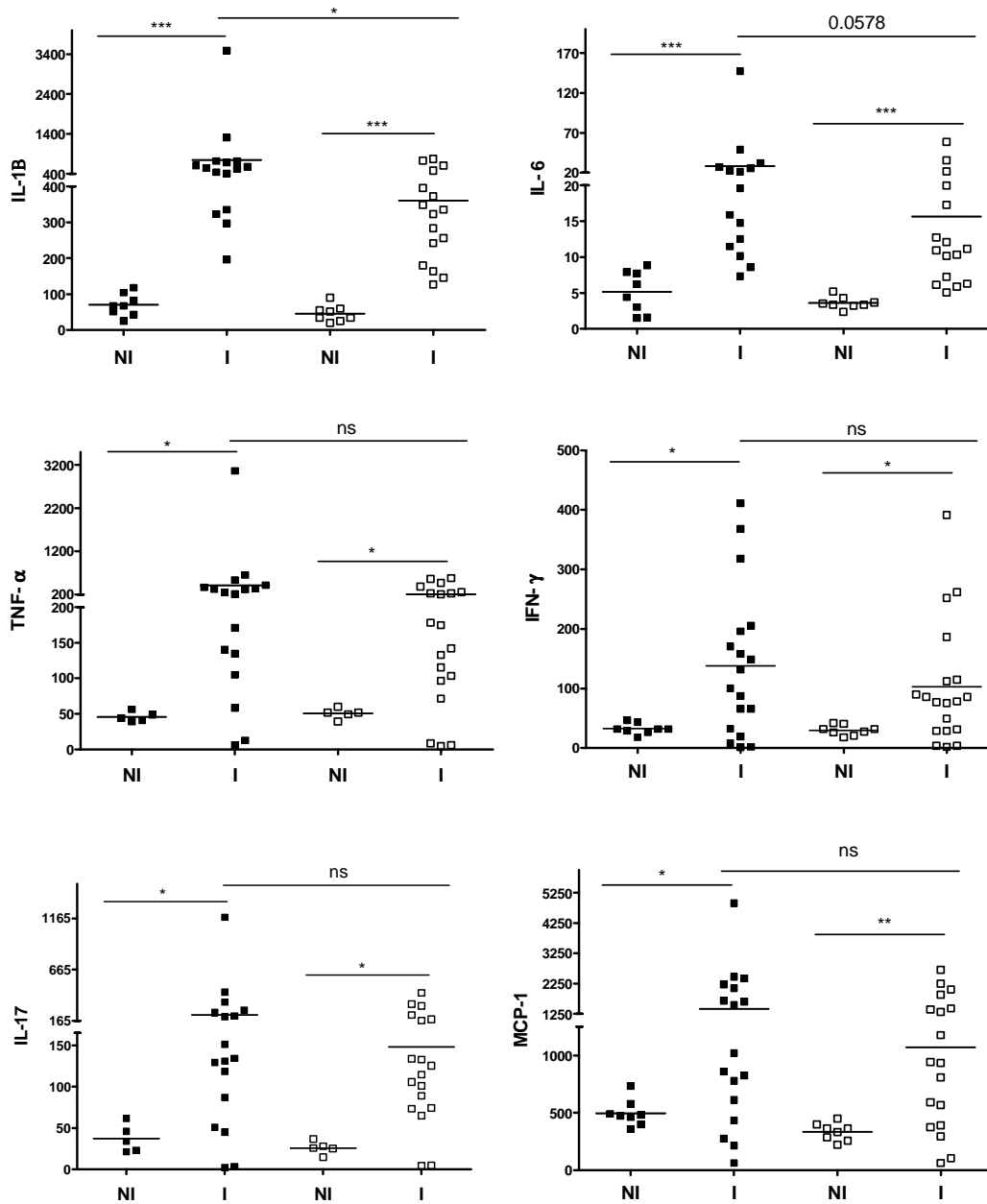
**Figura 15. Valores de Ficolina-1 medidos por ELISA. (A) Ratones WT y CD38ko a la semana 6ª desde la primera inmunización. (B) Ratones AIC+ y AIC-, ratones WT y CD38ko sin inmunizar y ratones WT y CD38ko inmunizados con CFA/IFA a la semana 6ª desde la primera inmunización**

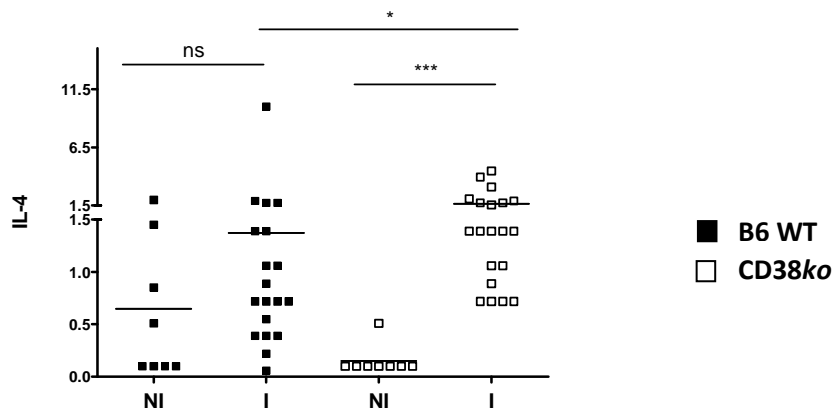


### 9. Determinación de citoquinas en suero

Como complemento al estudio proteómico de expresión diferencial en el suero de ratones inmunizados con Col.II, se midieron los niveles séricos de ciertas citoquinas a la semana 6<sup>o</sup> desde la primera inyección para conocer si dichos niveles pudieran reflejar la situación del desarrollo de la patología y en último término la distinta respuesta ante la inducción de la enfermedad. De forma similar a como ha sido descrito anteriormente, una vez determinados los niveles de citoquinas se agrupan los datos en función de si corresponden a ratones WT o CD38ko o en función del grado de afectación de la artritis inducida. Así, tal y como se observa en la Figura 16, la citoquina típicamente proinflamatoria IL-1 $\beta$  aparece sobreexpresada en de forma significativa en los ratones WT en comparación con los CD38ko. Para el resto de citoquinas medidas IL-6 ( $P= 0.0578$ ), IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y MCP-1 no se aprecian diferencias significativas entre ratones WT en comparación con los ratones CD38ko. De forma destacada, la menor severidad de los ratones CD38ko queda reflejada en el aumento significativo de los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-4 en comparación con los ratones WT (Figura 16).

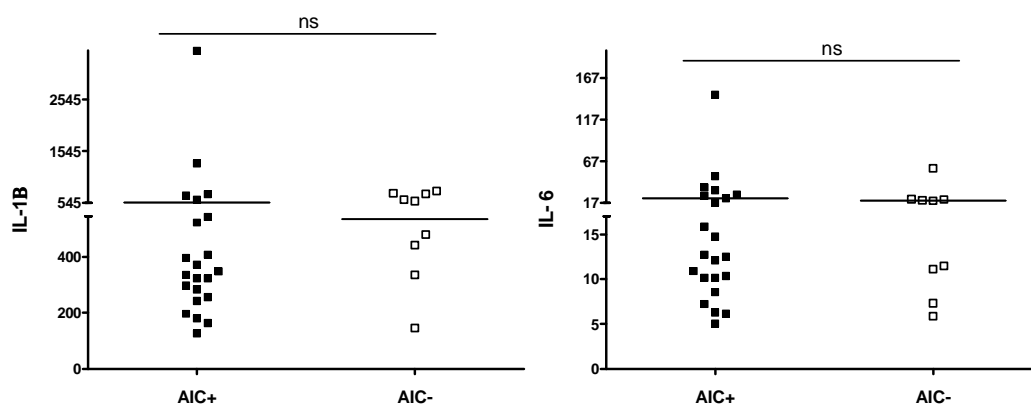
**Figura 16.** Determinación de citoquinas en suero de ratones no inmunizados (NI) e inmunizados con COL+CFA (I), tras las semana 6 desde la primera inmunización. Los datos aparecen en unidades de pg/ml  $\pm$ SD.

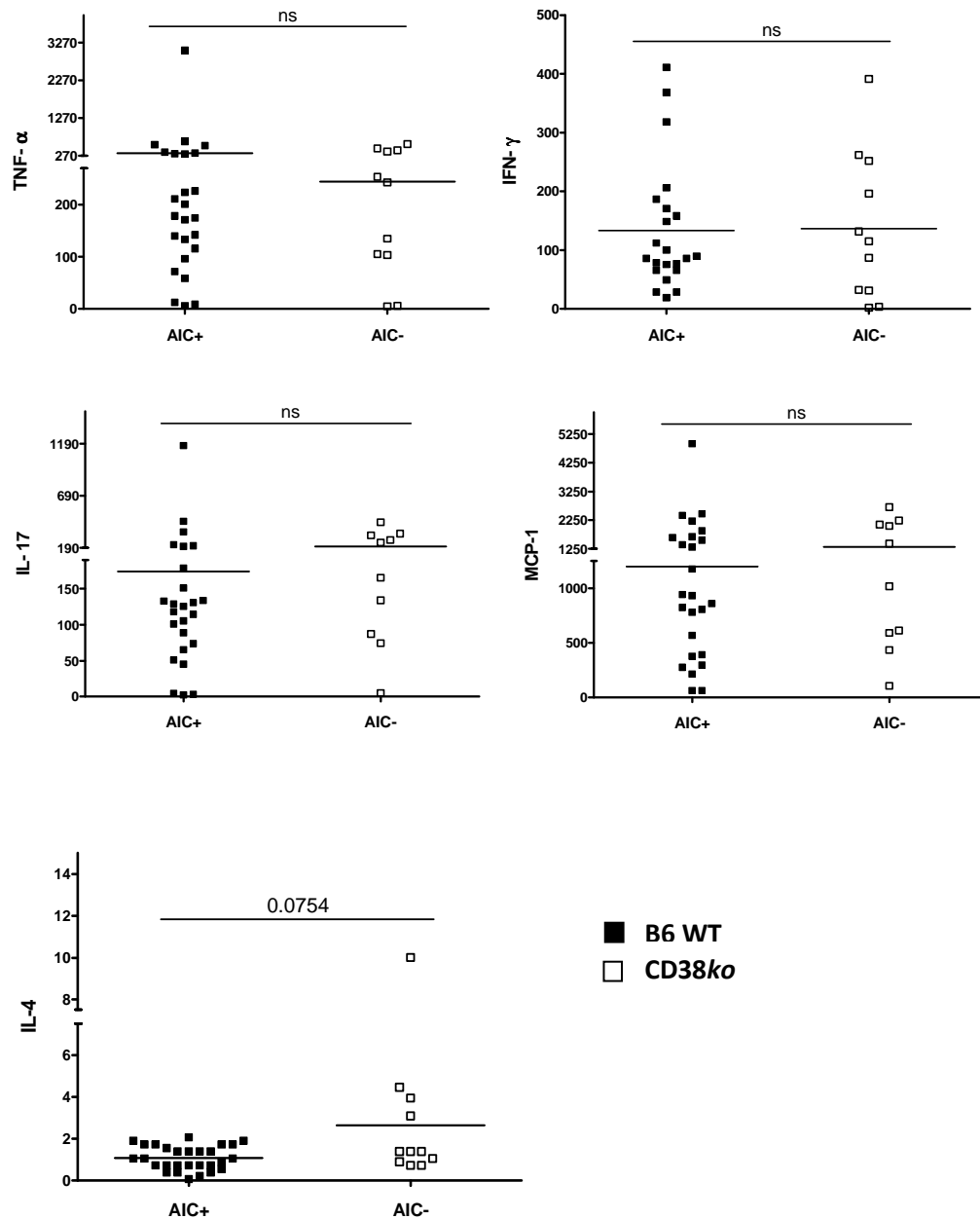




Cuando los datos se agrupan en función de la afectación de los ratones ( $AIC^+$  vs  $AIC^-$ ) (Figura 17) para ninguna de las citoquinas aparecen diferencias significativas entre estos grupos siendo sólo destacable la diferencia para IL-4 ( $P=0.0754$ ) entre los ratones afectados y no afectados por la artritis inducida, aun no siendo una diferencia estadísticamente significativa.

**Figura 17.** Determinación de citoquinas en suero tras la semana 6ª desde la primera inmunización, agrupados los datos en función de si los ratones resultan afectados o no de la artritis inducida,  $AIC^+$  y  $AIC^-$  respectivamente. Los datos aparecen en unidades de pg/ml  $\pm$ SD.



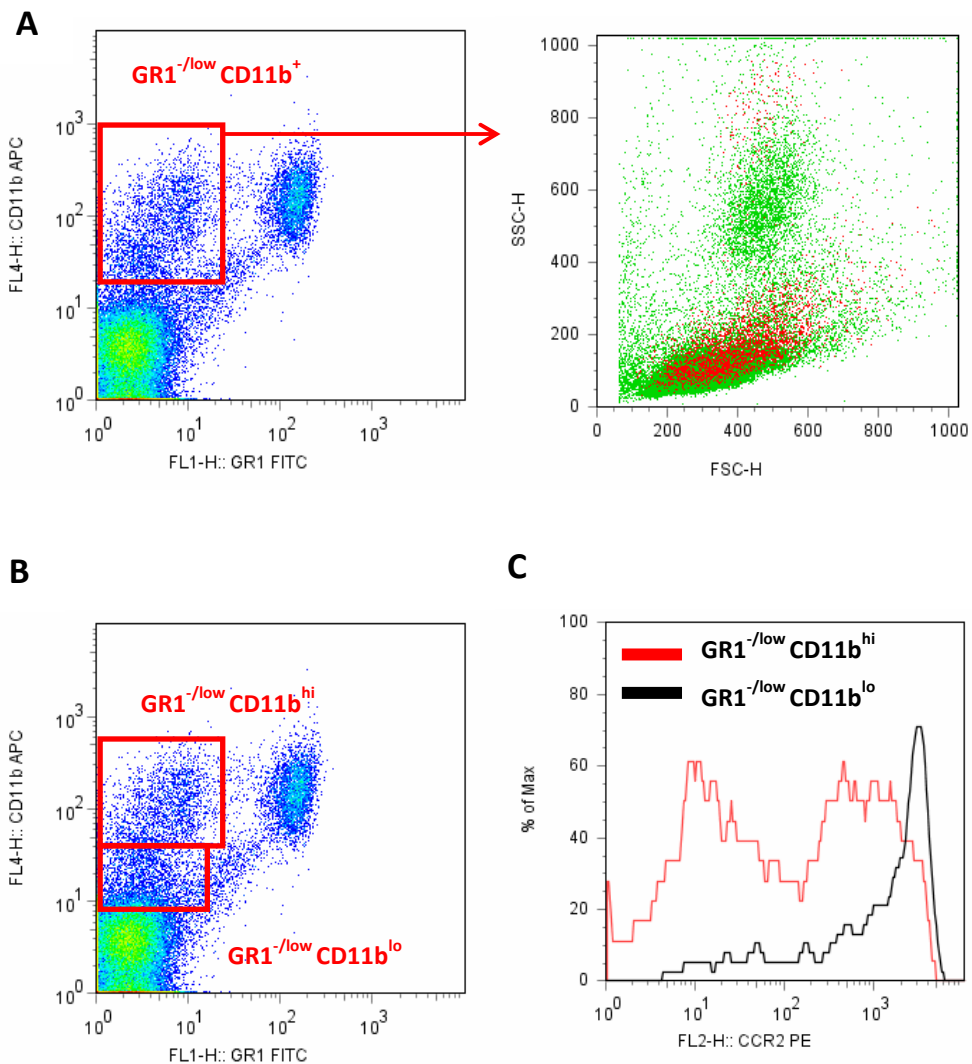


## 10. Células inmunitarias inflamatorias implicadas en el desarrollo de la AIC

En relación con el hallazgo de una serie de proteínas incrementadas en ratones WT que se relacionan con inflamación como la Ficolina-1 o SAA, en ratones B6 WT y CD38ko inmunizados con colágeno de pollo tipo II en CFA (Col.II+CFA) se realizó un estudio exhaustivo del fenotipo (y función) de aquellas células más relacionadas con inflamación, como son los neutrófilos y las distintas subpoblaciones de monocitos.. Para ello, a los 15 días, 20 días y 7 semanas tras la primera inyección con Col IIse

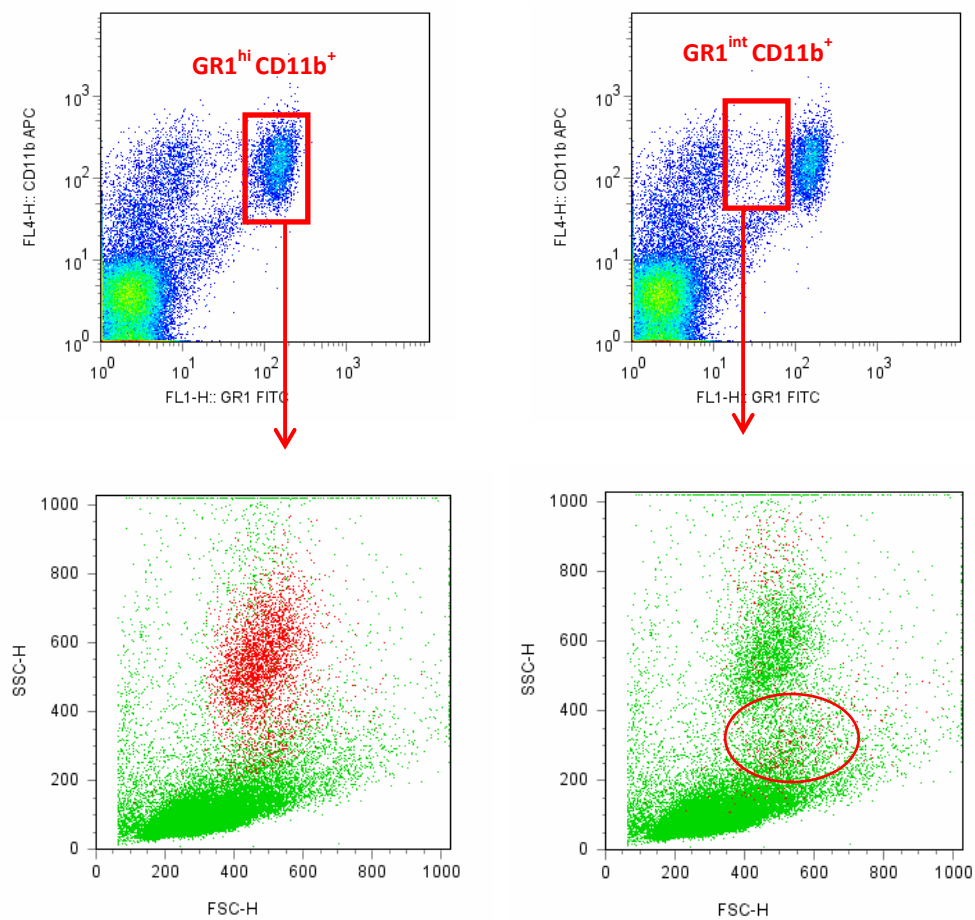
analizaron en bazo, sangre y médula ósea las poblaciones de neutrófilos y monocitos por citometría de flujo utilizando principalmente anticuerpos monoclonales específicos para los marcadores Gr1, CD11b y CCR2. CD11b es una glicoproteína de 170 kDa también conocida por  $\alpha$ M integrina, la subunidad alpha de Mac1, CR3 y Ly-40. CD11b es miembro de la familia de las integrinas y se expresa principalmente, aunque no exclusivamente, en células de origen mieloide (granulocitos y monocitos/macrófagos). Por otro lado, Gr-1 define a una proteína de 21-25 kDa conocida también como Ly-6G/Ly-6C. Este antígeno de diferenciación de células mieloides es una proteína unida a GPI que se expresa en la superficie de granulocitos y macrófagos. En médula ósea su nivel de expresión correlaciona directamente con el grado de diferenciación y maduración de los granulocitos, siendo máxima en granulocitos maduros, intermedia en células mieloides inmaduras y negativa o muy débil en monocitos. De esta forma en combinación con CD11b, y en función del tamaño y complejidad de las células y de su origen (médula, sangre, bazo) podemos distinguir al menos tres subpoblaciones de células de origen mieloide: neutrófilos, células mieloides inmaduras (entre las que se incluyen las conocidas con sus siglas en inglés como MDSCs: Myeloid-Derived Suppressor Cells) y monocitos/macrófagos. El marcador CCR2, también conocido como CD192, es el receptor específico para la quimioquina MCP-1 (CCL2) que participa entre otras funciones en el reclutamiento de monocitos/macrófagos y células dendríticas de origen mieloide a los sitios de infección.

La combinación de marcadores Gr1<sup>-low</sup> Cd11b<sup>+</sup> define un conjunto de células que en su gran mayoría se identifican con monocitos (Figura 18-A). Por otro lado, dentro de esta subpoblación pueden definirse dos poblaciones considerando si respecto a CD11b se considera *hi* (*high*) o *lo* (*low*) (Figura 18-B). Para estas dos subpoblaciones en función de si son *hi* o *low* para CD11b consideramos las células que resultan CD11b *hi* ya que en comparación con las CD11b<sup>low</sup> presentan un mayor porcentaje de células positivas *high* para CCR2, que podrían considerarse como monocitos inflamatorios (Figura 18-C).



**Figura 18.** (A) Ejemplo de representación *dot-plot* de una suspensión celular de bazo para los marcadores GR1 y CD11b que permiten definir una población de células  $Gr1^{-/low} Cd11b^{+}$  cuya distribución en la representación tamaño – complejidad (FSC-SSC) permite identificarse como monocitos, en rojo. (B) Subpoblaciones en función de CD11b que pueden definirse dentro de la población  $Gr1^{-/low} Cd11b^{+}$ . (C) Histograma para el marcador CCR2 sobre las subpoblaciones  $Gr1^{-/low} Cd11b^{hi}$  y  $Gr1^{-/low} Cd11b^{lo}$ , indicando el mayor nº de células CCR2+ hi dentro de la subpoblación  $Gr1^{-/low} Cd11b^{hi}$  que podrían identificarse como monocitos inflamatorios.

El marcaje con Gr1 y CD11b permite definir una población de células de origen mieloide que incluyen granulocitos y monocitos maduros e inmaduros. El análisis por citometría de flujo permitió distinguir dos poblaciones de células basadas en la expresión de Gr-1 que fueron denominadas como  $Gr-1^{hi} Cd11b^{+}$  y  $Gr-1^{int} Cd11b^{+}$  (Figura 19). La primera población correspondería con granulocitos maduros mientras que la segunda constituye una población de origen mieloide de células inmaduras conocida como MDSC (células supresoras de origen mieloide) [11].

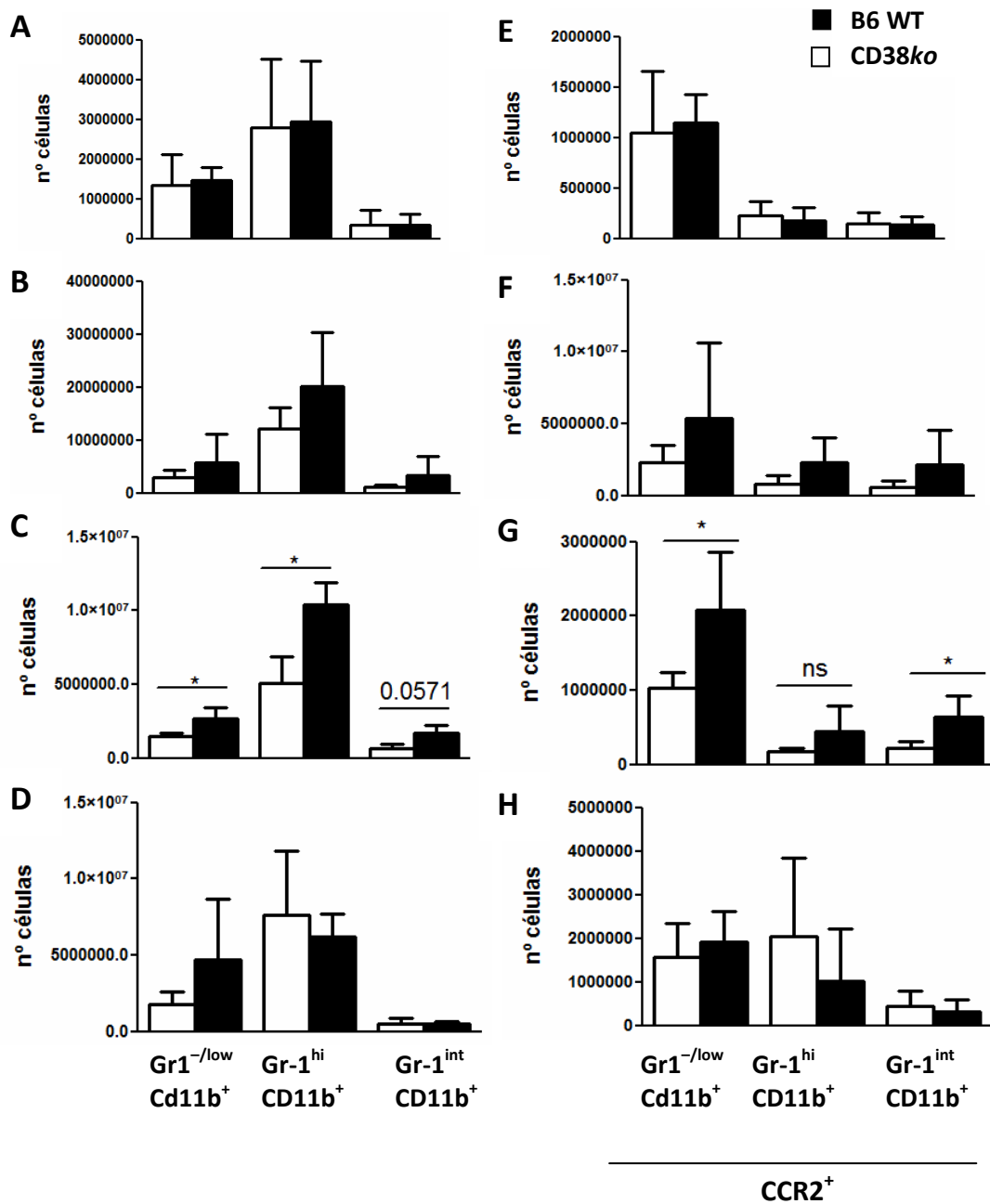


**Figura 19.** (A) Ejemplo de representación *dot-plot* de una suspensión celular de bazo para los marcadores GR1 y CD11b que permiten definir las poblaciones de células  $Gr1^{hi} Cd11b^{+}$  y  $Gr1^{int} Cd11b^{+}$  cuya distribución en la representación tamaño – complejidad (FSC-SSC) permite identificarse como neutrófilos y células mieloides inmaduras respectivamente, en rojo.

En bazo, basalmente no se apreció ninguna diferencia significativa en el número de células  $Gr1^{-/low} Cd11b^{+}$ ,  $Gr-1^{hi} CD11b^{+}$  y  $Gr-1^{int} CD11b^{+}$  entre los ratones B6 WT y CD38ko (Figura 20-A). A los 10 días desde la 1ª inmunización tampoco se apreciaron diferencias significativas en el n° de células de las poblaciones estudiadas aunque sí un n° mayor de células en los ratones CD38ko frente a los WT (Figura 20-B). A los 20 días, estas diferencias sí que resultaron significativas para las poblaciones  $Gr1^{-/low} Cd11b^{+}$ ,  $Gr-1^{hi} CD11b^{+}$  (Figura 20-C); mientras que para la semana 6ª estas diferencias no se parecían de igual forma y aunque para  $Gr1^{-/low} Cd11b^{+}$  el n° de



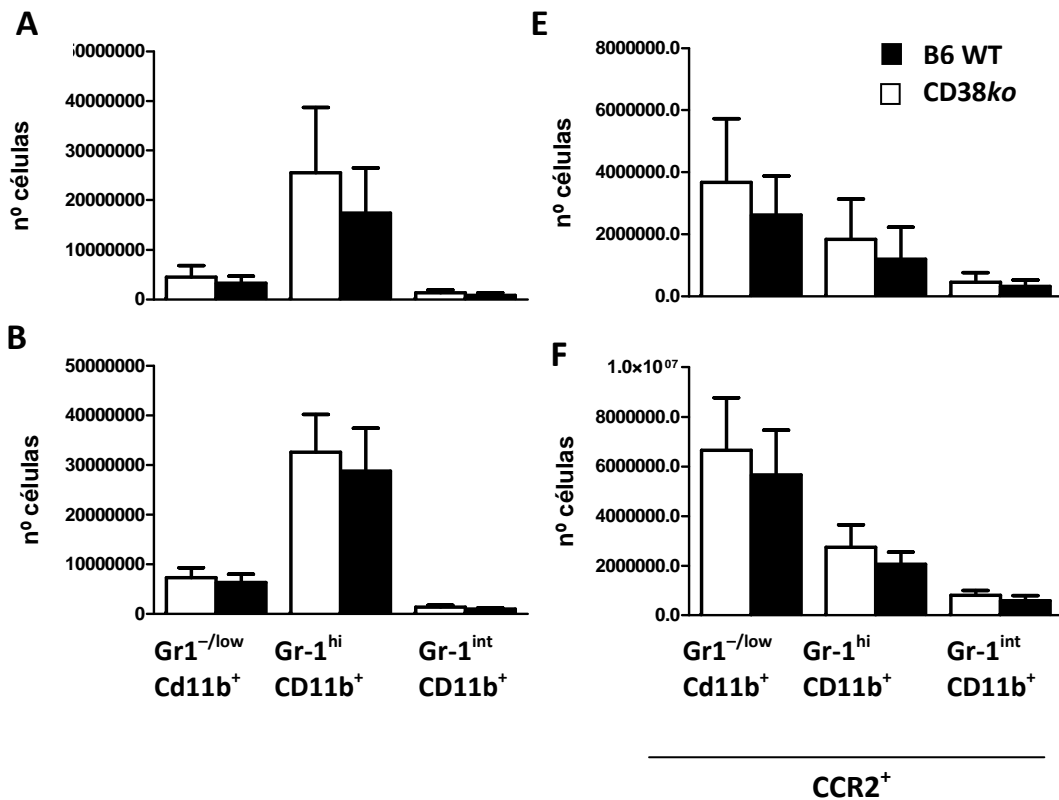
células sigue siendo mayor en CD38ko que en WT, para las poblaciones Gr-1<sup>hi</sup> CD11b<sup>+</sup> y Gr-1<sup>int</sup> CD11b<sup>+</sup> el n° de células a diferencia de lo que se observa a 20 días resulta mayor en WT que en CD38ko y similar entre ambos grupos, respectivamente (Figura 20-D)

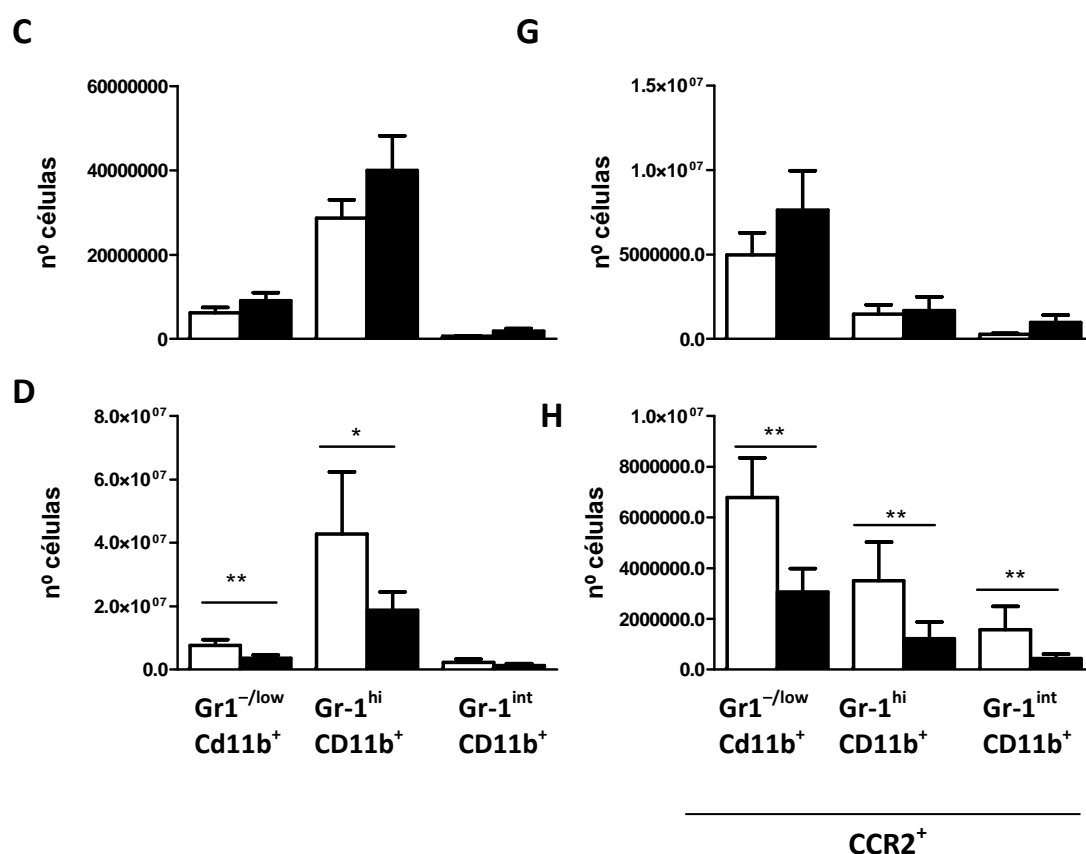


**Figura 20.** A la izquierda, n° de células Gr-1<sup>-/low</sup> Cd11b<sup>+</sup>, Gr-1<sup>hi</sup> CD11b<sup>+</sup> y Gr-1<sup>int</sup> CD11b<sup>+</sup> en bazo en condiciones basales (A) y tras 10 días (B), 20 días (C) y 6 semanas (D) desde la 1ª inmunización. A la derecha, n° de células CCR2<sup>+</sup> para las subpoblaciones Gr-1<sup>-/low</sup> Cd11b<sup>+</sup>, Gr-1<sup>hi</sup> CD11b<sup>+</sup> y Gr-1<sup>int</sup> CD11b<sup>+</sup> en condiciones basales (E) y tras 10 días (F), 20 días (G) y 6 semanas (H) desde la 1ª inmunización.

Además, respecto a las células positivas para CCR2, a los 20 días desde la primera inmunización dentro de las subpoblaciones  $Gr1^{-/low} CD11b^{hi}$  y  $Gr-1^{int} CD11b^{+}$  existen diferencias en el porcentaje de células que son positivas para CCR2 comparando WT frente a CD38ko (Figura 20-G).

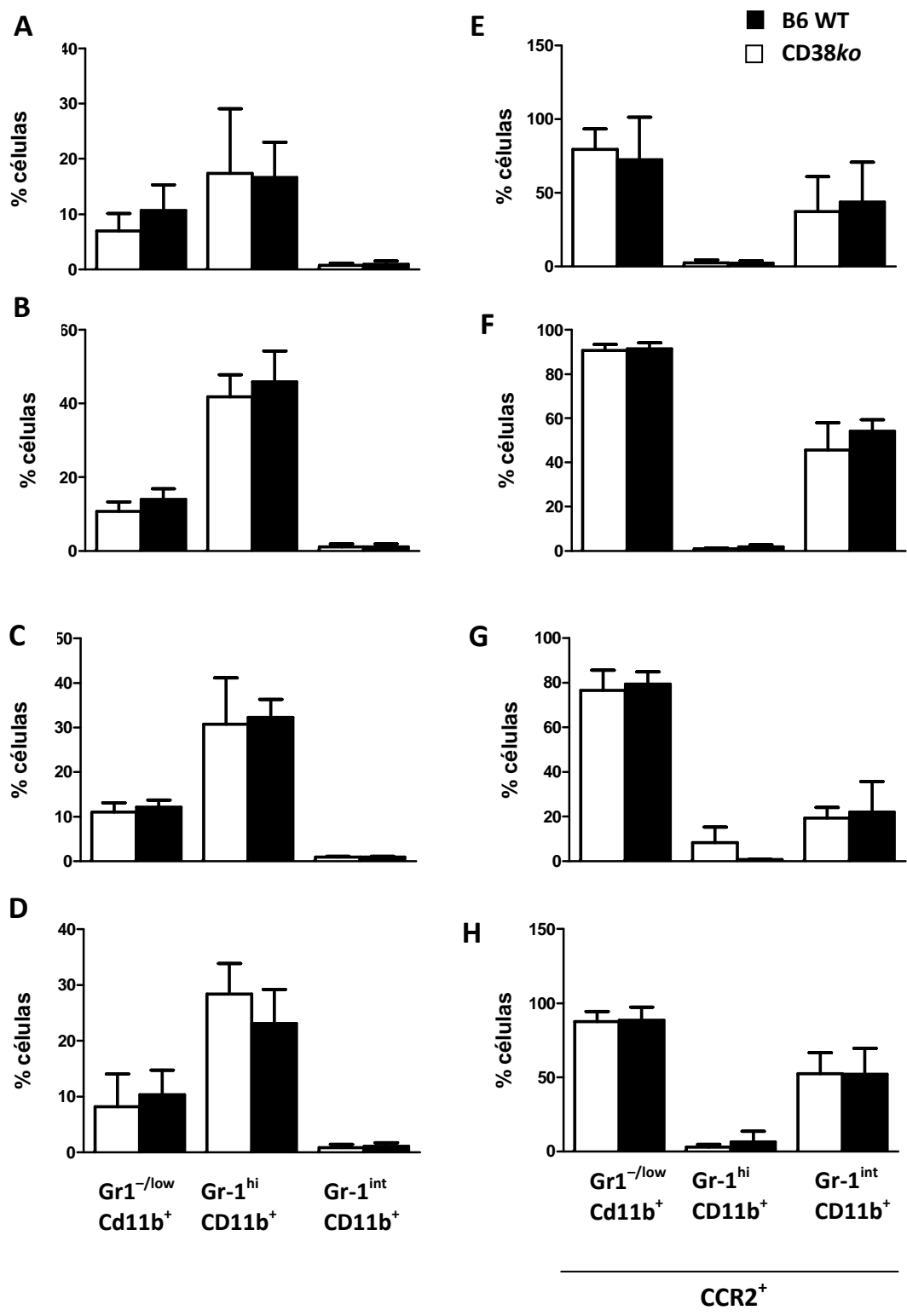
En médula ósea (Figura 21), las diferencias aparecieron a la semana 6ª para la subpoblaciones  $Gr1^{-/low} Cd11b^{+}$  y  $Gr-1^{hi} CD11b^{+}$  con un mayor n° de células en estas poblaciones para los WT en comparación con los CD38ko (Figura 21-D). Además, respecto a las células positivas para CCR2, a las 6 semanas desde la primera inmunización dentro de las subpoblaciones  $Gr1^{-/low} Cd11b^{+}$ ,  $Gr-1^{hi} CD11b^{+}$  y  $Gr-1^{int} CD11b^{+}$  existen diferencias en el porcentaje de células que son positivas para CCR2 comparando WT frente a CD38ko (Figura 21-G).





**Figura 21.** A la izquierda, n° de células Gr-1<sup>-/low</sup> CD11b<sup>+</sup>, Gr-1<sup>hi</sup> CD11b<sup>+</sup> y Gr-1<sup>int</sup> CD11b<sup>+</sup> en médula ósea en condiciones basales (A) y tras 10 días (B), 20 días (C) y 6 semanas (D) desde la 1ª inmunización. A la derecha, n° de células CCR2<sup>+</sup> para las subpoblaciones Gr-1<sup>-/low</sup> CD11b<sup>+</sup>, Gr-1<sup>hi</sup> CD11b<sup>+</sup> y Gr-1<sup>int</sup> CD11b<sup>+</sup> en condiciones basales (E) y tras 10 días (F), 20 días (G) y 6 semanas (H) desde la 1ª inmunización.

En sangre, no se apreciaron diferencias significativas para las subpoblaciones Gr-1<sup>-/low</sup> Cd11b<sup>+</sup>, Gr-1<sup>hi</sup> CD11b<sup>+</sup> y Gr-1<sup>int</sup> CD11b<sup>+</sup> entre WT y CD38ko ni para las células que eran CCR2<sup>+</sup> dentro de las mismas poblaciones (Figura 22). Si se aprecia sobre todo respecto a los niveles basales (A) un aumento de la población correspondiente a granulocitos a los 10 días tras la inmunización (B).



**Figura 22.** A la izquierda, nº de células  $Gr1^{-/low} Cd11b^+$ ,  $Gr-1^{hi} CD11b^+$  y  $Gr-1^{int} CD11b^+$  en sangre en condiciones basales (A) y tras 10 días (B), 20 días (C) y 6 semanas (D) desde la 1ª inmunización. A la derecha, nº de células  $CCR2^+$  para las subpoblaciones  $Gr1^{-/low} Cd11b^+$ ,  $Gr-1^{hi} CD11b^+$  y  $Gr-1^{int} CD11b^+$  en condiciones basales (E) y tras 10 días (F), 20 días (G) y 6 semanas (H) desde la 1ª inmunización.

## 11. Influencia de CXCL12 en la movilización celular durante el proceso de inmunización

CD38 ha sido descrito como regulador de la movilización de ciertas células como neutrófilos y células dendríticas en respuesta a ciertos estímulos [12, 13]. Uno de esos estímulos es la quimioquina CXCL-12 que mediante su receptor específico CXCR4 (CD184) participa en la movilización de células inmunitarias en procesos inflamatorios [14]. Nos propusimos evaluar la expresión de CD184 en distintos tipos celulares durante el proceso de inducción de la artritis para evaluar si CD38 mediante este mecanismo pudiera tener influencia en la distinta respuesta de los ratones B6 WT y CD38ko ante la inducción de la artritis experimental.

Mediante los marcadores Ly6C y Ly6G definimos las poblaciones de monocitos proinflamatorios y granulocitos para junto con el marcador CD184 realizar un seguimiento de estas células durante el proceso de inmunización a distintos tiempos en los órganos de bazo, médula ósea y sangre (Figura 23)

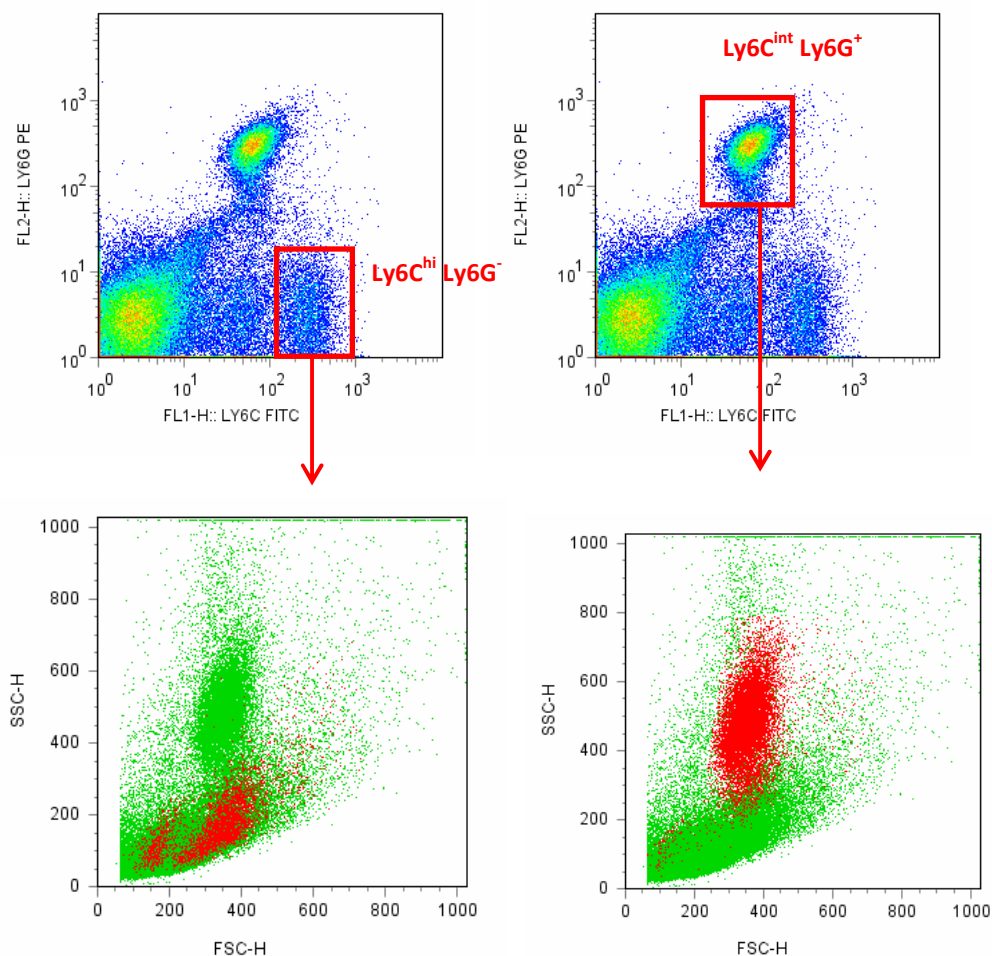
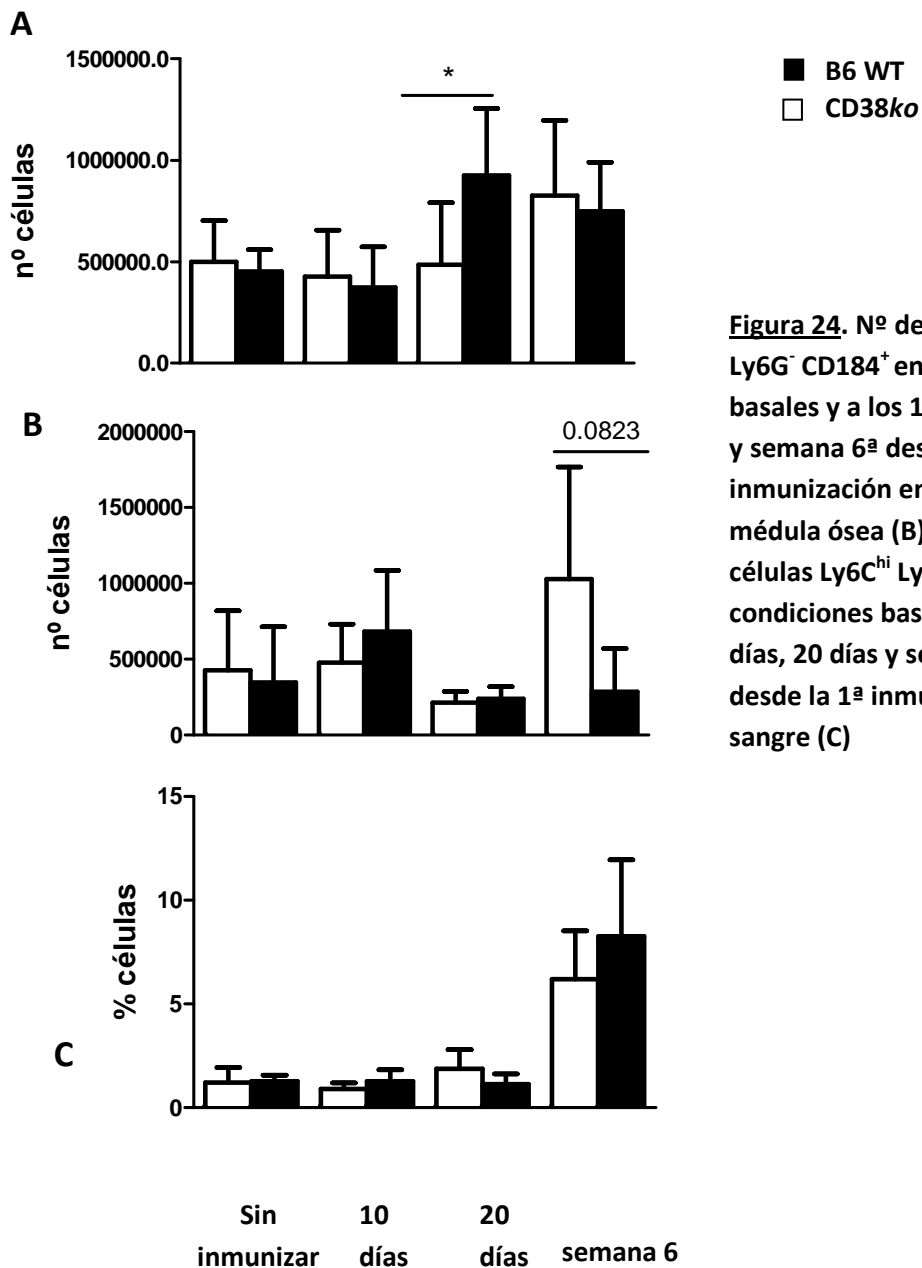


Figura 23

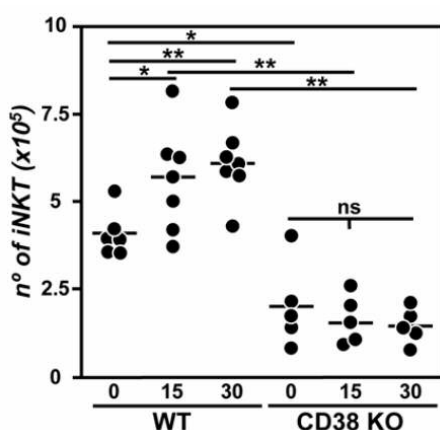
Para la población Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> CD184<sup>+</sup>, en bazo se observó un aumento en el n<sup>o</sup> de células respecto a los ratones sin inmunizar ya sean WT y CD38ko a lo largo de los distintos tiempos medidos y cómo a los 20 días un mayor n<sup>o</sup> de estas células en el bazo de los ratones CD38ko frente a los WT (Figura 24-A). A la 6<sup>a</sup> semana desde la primera inmunización esta diferencia se reestablece e incluso aparece un n<sup>o</sup> mayor en los ratones WT respecto a los CD38ko. En médula ósea se observó un aumento en el n<sup>o</sup> de las células Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> CD184<sup>+</sup> a los 10 días respecto a los ratones sin inmunizar, a los 20 días estos valores descendían para a la semana 6<sup>a</sup> producirse un aumento sobre todo en los ratones WT frente a los CD38ko (Figura 24-B).



**Figura 24.** N<sup>o</sup> de células Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> CD184<sup>+</sup> en condiciones basales y a los 10 días, 20 días y semana 6<sup>a</sup> desde la 1<sup>a</sup> inmunización en bazo (A) y médula ósea (B). % de de células Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup> CD184<sup>+</sup> en condiciones basales y a los 10 días, 20 días y semana 6<sup>a</sup> desde la 1<sup>a</sup> inmunización en sangre (C)

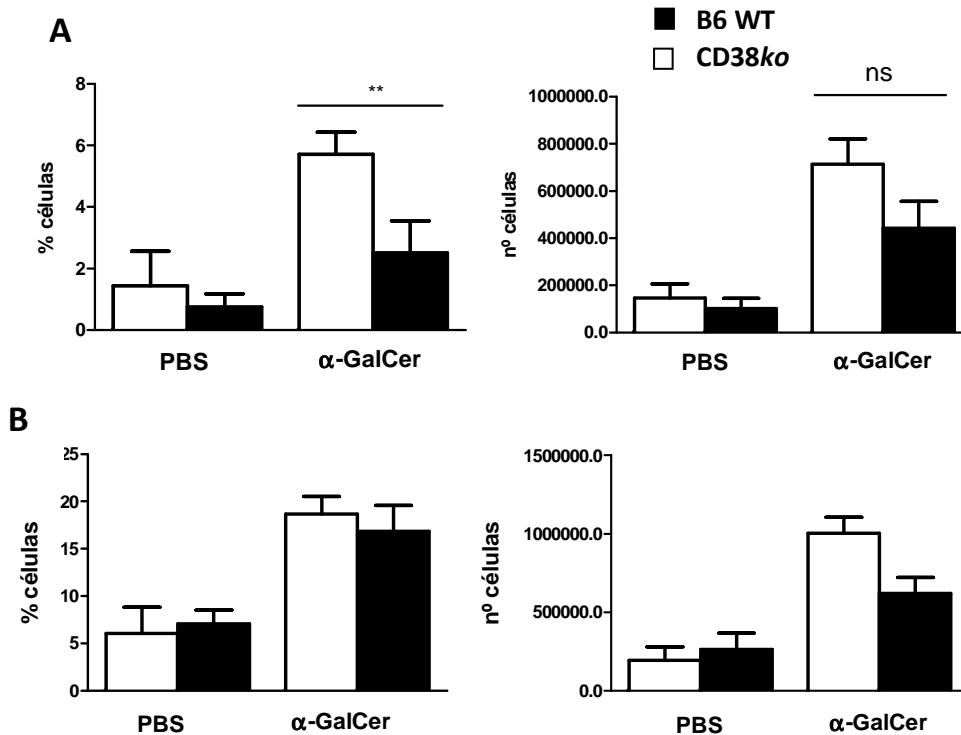
## 12. Participación de las células iNKT e influencia sobre precursores de osteoclastos

Como fue comentado en la introducción, la ausencia de CD38 en los ratones CD38ko provoca una acumulación de NAD<sup>+</sup> que desencadena la ADP ribosilación del receptor purinérgico P2X7 y su activación ATP independiente iniciando un proceso de apoptosis inducida por NAD en linfocitos T naive, T reguladores y células NKT [15]. En ratones no inmunizados CD38ko, el número de células iNKT en bazo es mucho menor que en los ratones B6 WT y a consecuencia de la inmunización con Col II+CFA se produce un aumento en bazo en los ratones WT, situación que no se produce en los ratones CD38ko (Figura 25). Mediante citometría de flujo las células iNKT pueden ser caracterizadas como CD1d<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup>.



**Figura 25.** N° de células iNKT en el bazo de ratones WT y CD38ko en condiciones basales y tras 15 y 30 días desde la primera inmunización [1]

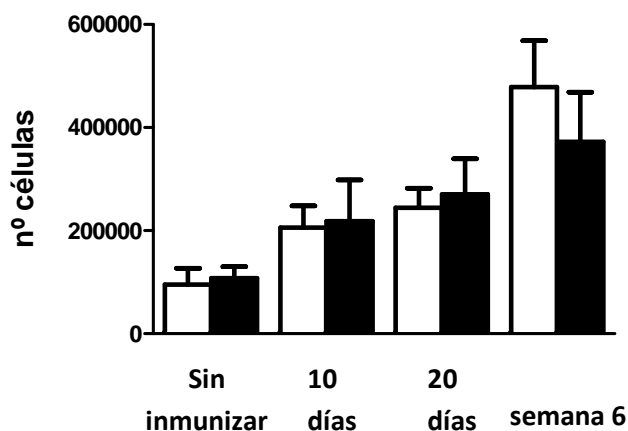
Observado este hecho, se analizó la influencia que la expansión de células iNKT pudiera tener sobre la generación de una población de reciente descripción como precursores de osteoclastos que han sido definidos mediante los marcadores B220<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> CD11b<sup>-/low</sup> CD115<sup>+</sup> y CD117<sup>+</sup> [16]. Tras la inmunización con  $\alpha$ -GalactosilCeramida se determinó que el porcentaje en bazo de las células iNKT era superior en los ratones WT frente a los CD38ko y en comparación con la inmunización con el control (PBS) donde no se produjo una expansión de estas células (Figura 26-A). El marcaje para las células precursoras de osteoclastos en médula ósea como B220<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> CD11b<sup>-/low</sup> CD115<sup>+</sup> CD117<sup>+</sup> reflejó un aumento de estas células respecto a la inmunización con el vehículo control (PBS) y en WT respecto a los ratones CD38ko (Figura 26-B).



**Figura 26.** (A) % y nº de células iNKT en el bazo de ratones WT y CD38ko a las 72h tras la inyección de  $\alpha$ -GalCer. (B) % y nº de células B220<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD11b<sup>-low</sup> CD115<sup>+</sup> CD117<sup>+</sup> como precursores de osteoclastos en la médula ósea de ratones WT y CD38ko a las 72h tras la inyección de  $\alpha$ -GalCer

Además de la influencia de la activación de las iNKT sobre la generación de la población de precursores de osteoclastos identificados como B220<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD11b<sup>-low</sup> CD115<sup>+</sup> CD117<sup>+</sup>, se realizó un seguimiento de esta población en médula ósea a lo largo del proceso de inmunización a los 10 días, 20 días y a la semana 6<sup>a</sup> desde la primera inmunización. En la Figura 27 aparece cómo durante el proceso de inmunización se produce un aumento en el nº de células correspondiente a esta población sin diferencias entre los ratones B6 WT y CD38ko hasta la semana 6<sup>a</sup> donde el nº de células correspondiente a esta población resulta mayor en los ratones B6 WT respecto a los CD38ko.



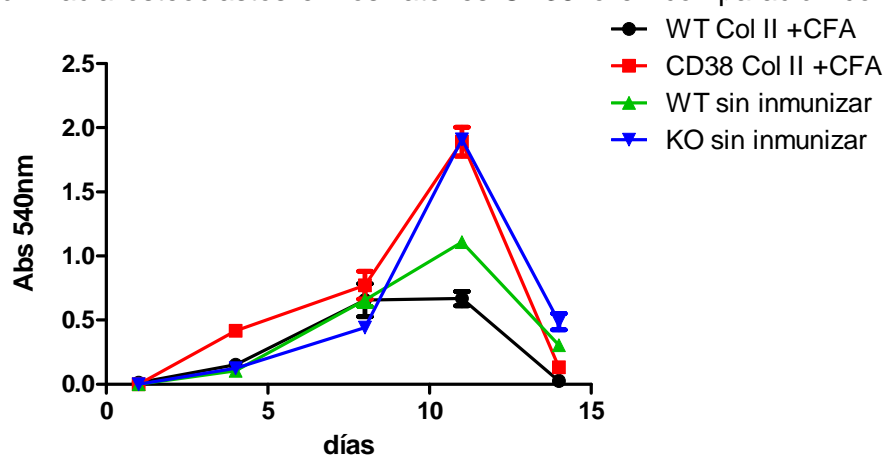


**Figura 27.** Nº de células B220<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> CD11b<sup>-/low</sup> CD115<sup>+</sup> CD117<sup>+</sup> como precursores de osteoclastos en la médula ósea de ratones WT y CD38ko en condiciones basales y tras 10 días, 20 días y 6 semanas desde la 1ª inmunización

### **13. Implicación de CD38 en la diferenciación hacia osteoclastos**

En el trabajo publicado acerca del modelo de artritis inducida en los ratones CD38ko se describió cómo los ratones CD38ko desarrollaban una artritis inducida menos severa que la producida en ratones B6 WT [1]. Además, los análisis radiológicos permitían adivinar una reducción de lesiones óseas en los ratones CD38ko en comparación con los B6 WT. Por otro lado, se ha descrito de forma extensa por el laboratorio de M. Zaidi la participación de CD38 y productos asociados sobre la actividad de los osteoclastos y el metabolismo óseo. Inicialmente, fue descrito cómo en los ratones CD38ko existía una mayor actividad de los osteoclastos dando lugar a una reducida densidad ósea comparada con los ratones control ya que en estos últimos, la movilización de los reservorios de calcio por la cADPR daba lugar a una inhibición de la actividad osteoclástica en comparación con los Cd38<sup>-/-</sup> [17]. Más recientemente se ha demostrado la implicación de los metabolitos de CD38 en el metabolismo óseo de manera que el principal producto de CD38, la ADPR, actuaría como inhibidor de la osteoclastogénesis mientras que la cADPR tendría un efecto de potenciador de la osteoclastogénesis al contrario de lo considerado inicialmente [18].

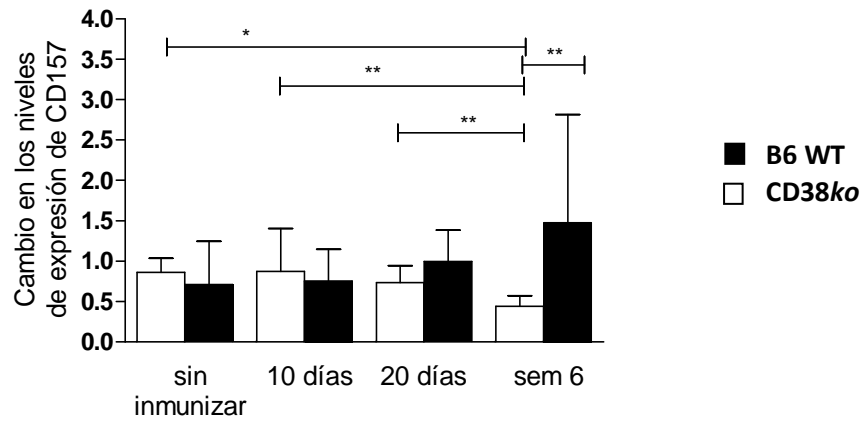
Con estos antecedentes, evaluamos si existía alguna diferencia en la diferenciación *in vitro* hasta osteoclastos entre los ratones B6 WT y CD38<sup>ko</sup> en ratones sin inmunizar y ratones inmunizados con Col II+CFA tras 20 días desde la 1<sup>a</sup> inmunización. A partir de células de médula ósea se realizó la diferenciación hasta osteoclastos con M-CSF y RANKL hasta 14 días realizando la detección en sobrenadante de cultivo de la enzima específica de osteoclastos TRAP. A los 8 días de diferenciación es cuando se obtuvieron el máximo de diferenciación medida por absorbancia sobre la actividad de TRAP. Como se observa en la Figura 28, tanto en los ratones sin inmunizar como en los inmunizados se obtuvieron valores de abs para TRAP superiores a los respectivos para los ratones WT sugiriendo una mayor diferenciación hacia osteoclastos en los ratones CD38<sup>ko</sup> en comparación con los B6 WT.



**Figura 28. Diferenciación *in vitro* hacia osteoclastos y determinación en sobrenadante de cultivo de la enzima específica para osteoclastos TRAP**

Como CD38 podría tener un papel regulador sobre la osteoclastogénesis a través de su actividad enzimática, evaluamos el interés en determinar si otras enzimas como CD157 pudieran participar en los ratones CD38<sup>ko</sup> supliendo la falta de los productos generados por la actividad enzimática de Cd38 sobre el NAD<sup>+</sup>. Así, mediante RT-PCR se evaluó la expresión de CD157 en las articulaciones de ratones B6 WT y CD38<sup>ko</sup> sin inmunizar e inmunizados con Col II+CFA para cada grupo a lo largo del proceso de inducción de la artritis (Figura 29). En los ratones sin inmunizar y tras 10 días desde la 1<sup>a</sup> inmunización no se apreciaron diferencias en la expresión de

CD157 entre los ratones WT y CD38ko. A los 20 días desde la 1ª inmunización podía observarse una diferencia entre WT y CD38ko y a la semana 6ª un aumento en la expresión de CD157 en los ratones CD38ko frente a WT y a los tiempos medidos previos.



**Figura 29.** Cambio de los niveles de expresión de CD157 en articulaciones durante el proceso de inmunización

# *Discusión*



## G) DISCUSIÓN

Como resultados de la presente Tesis Doctoral, inicialmente fue presentado un estudio sobre el fraccionamiento del suero por Proteominer previo a una serie de estudios de expresión diferencial mediante 2D-DIGE sobre el suero de ratones CD38ko y B6 WT inmunizados con Col.II+CFA/Col.II+IFA, inmunizados con CFA/IFA o sin inmunizar, con el objetivo de encontrar perfiles de expresión proteica entre los grupos en estudio.

La eficacia del proceso de enriquecimiento del suero quedó reflejado en los perfiles obtenidos para las muestras de suero sin fraccionar y tras el fraccionamiento con Proteominer de manera que en la separación de estas muestras en geles 1-D y 2-D se podían detectar una serie de bandas y manchas proteicas que en el suero sin fraccionar resultan imposibles de detectar. Se detectaron alrededor de unas 300 manchas proteicas por gel, 147 de ellas identificadas por espectrometría de masas que se correspondían con 60 proteínas únicas. EL 60% de estas proteínas pueden clasificarse como representativas del denominado “Proteoma oculto” y alrededor de la mitad de ellas son proteínas muy poco abundantes en suero (concentración inferior a 1 µg/ml), o son proteínas de origen celular cuya concentración en el suero bajo condiciones normales es muy baja. Además, como diferencia al fraccionamiento mediante depleción se pudo comprobar cómo el proceso de ecualización de la muestra con Proteominer permitía identificar una misma proteína en el suero sin fraccionado y fraccionado, véase la Albúmina sérica para la que se producía una reducción en su concentración alrededor del 75%. El objetivo de las librerías de hexapéptidos no es eliminar las proteínas mayoritarias si no variar las concentraciones relativas de las proteínas de la muestra. Una aproximación cuantitativa sobre el proceso de enriquecimiento con Proteominer ha sido descrita en el trabajo de van Toerne y col., donde describe una eficiencia en la depleción entre el 60 y 90 % para las 13 proteínas con mayor concentración en el plasma de ratón, incluyendo la albúmina, transferrina y las haptoglobinas [8]. Sobre esta cuestión, en nuestro caso tras el proceso de fraccionamiento del suero ni la subunidad alpha ni beta de la haptoglobina han podido ser detectadas e identificadas en los geles 2-D (Anexo II y Anexo III). Por el contrario, el grado de enriquecimiento para proteínas de concentración media y baja en suero como ApoE, B2m, Ficolina-1 o GXP3 varía entre 13 y 34 veces. Como la mayoría de las proteínas con expresión diferencial en suero entre ratones B6 WT AIC+ y CD38ko AIC+ pertenecen al grupo de proteínas de baja

concentración o para el caso de Apo E y los componentes del Complemento C4-B y C3 no se corresponden con la mancha proteica mayoritaria, sin el proceso de enriquecimiento mediante Proteominer estas proteínas podrían no haber sido detectadas.

Para la inmunización de los ratones se siguió el mismo procedimiento, descrito por Inglis y col. [19], el cual implica el empleo de CFA como adyuvante estando constituido por un extracto de *Mycobacterium tuberculosis* que por sí mismo puede actuar como un potente agente inflamatorio [9]. Analizando las proteínas diferencialmente expresadas entre los grupos antes mencionados, puede determinarse que algunos de los cambios de expresión en proteínas observados no se deben de forma específica al proceso artrítico debido a la inyección con colágeno de pollo y podría reflejar la respuesta ocasionada por efecto del adyuvante o el moderado proceso artrítico tal como se refleja en los ratones CD38ko afectados de artritis. Así, por ejemplo, un incremento en la abundancia de la proteínas B2m fue detectada en los ratones CD38ko AIC+, en los ratones no afectados inmunizados con Col. II (tanto B6 WT como CD38ko) y en los ratones CD38ko tratados con CFA/IFA, en comparación con su respectivo grupo comparativo. En cualquier caso en humanos la proteína B2m ha sido aprobada como biomarcador en el diagnóstico de la artritis reumatoide activa y patologías de riñón [20, 21]. La proteína B2m corresponde con la cadena ligera de la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-I), es expresada por las células nucleadas y circula en sangre como una proteína monomérica de 99 aa (Pm-11.731.2). B2m además forma amiloidosis en la estructura articular en pacientes con fallo renal bajo tratamiento con hemodiálisis [22, 23]. Recientemente, esta proteína ha sido señalada como una posible diana terapéutica para el cáncer de próstata y carcinoma de células renales [24].

Sin embargo, tal y como se observa en la Tabla 9, el grupo de proteínas expresadas diferencialmente en respuesta al tratamiento con CFA/IFA no coincide exactamente con las proteínas expresadas diferencialmente en respuesta a la inmunización de los ratones con Col.II; incluso podría definirse un grupo de estas proteínas con capacidad para discriminar la moderada afectación artrítica observada en el grupo de ratones CD38ko AIC+. Cuando se realizó la comparación entre los ratones WT y CD38ko inmunizados con Col.II, agrupados en función del grado de afectación de artritis y en función del tipo de ratón, para la primera comparación las 28 proteínas expresadas diferencialmente entre los ratones AIC+ y AIC- (Tabla 4) permitían establecer una clasificación de los individuos para cada grupo aplicando un análisis multivariante sobre los datos de abundancia de estas proteínas con expresión

diferencial. Así, puede deducirse que el perfil de expresión de proteínas en suero entre estos ratones con diferente grado de afectación clínica permite clasificar y establecer diferencias en función del nivel de desarrollo de la afectación artrítica, existiendo además una correspondencia entre esta clasificación diferencial en función de los perfiles de expresión proteicos obtenidos y la afectación clínica determinado para cada grupo de ratones.

Por lo tanto, con la aproximación realizada mediante análisis de la expresión diferencial en suero mediante 2D-DIGE y un análisis multivariante mediante análisis por componentes principales y clasificación jerarquizada por dendogramas hemos conseguido diferenciar distintas condiciones experimentales relacionadas con la artritis, inflamación y ratones en condiciones basales entre ratones control B6 y ratones deficientes para CD38.

Se realizaron ensayos de ELISA y detección por Western Blot mediante anticuerpos específicos para verificar algunas proteínas expresadas diferencialmente tras el análisis de los sueros de ratón en el modelo de AIC por 2D-DIGE que pudieran resultar de interés para explicar la distinta situación fisiológica o el distinto comportamiento ante la inducción de la artritis. Las muestras de suero empleadas en estos ensayos se emplearon sin fraccionar para conocer la influencia del fraccionamiento mediante Proteominer en las concentraciones relativas de cada proteína, indicando de forma destacada que el proceso de ecualización de la muestra no afecta a la proporción relativa de cada proteína en la muestra dentro del rango estudiado. Mediante WB, una de las proteínas comprobadas fue la proteína IgG subunidad kappa, que fue identificada en varias manchas proteicas distintas y como varias subunidades distintas de la misma proteína. Los valores de abundancia de esta proteína eran superiores en los ratones afectados de artritis respecto a los no afectados, y respecto a los ratones sin inmunizar y tratados con CFA/IFA. Este aumento en los niveles de esta proteína es un reflejo directo de la actividad de la inmunidad adaptativa en la producción de anticuerpos y según lo esperado se encuentran niveles superiores en los ratones inmunizados con Col.II afectados de artritis respecto al resto de grupos. También se puede observar el efecto que el tratamiento con CFA/IFA produce ya que respecto a los ratones sin inmunizar, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, se produce un aumento en esta proteína aunque sin llegar a los niveles alcanzados en los ratones inmunizados con Col.II+CFA afectados de artritis, reflejo en estos últimos de una respuesta inmunitaria superior y más sostenida en el tiempo.



Para la proteína Apo AI, en la detección por el anticuerpo específico por WB sólo resultó identificable una banda cuyo Pm correspondía a las manchas proteicas más abundantes identificadas como Apo AI en los geles 2-D. Las diferencias observadas no permiten avalar la sobreexpresión de los ratones AIC- inmunizados con Col.II respecto a los AIC+. Para la proteína Apo E, el resultado tampoco permite avalar las diferencias encontradas en los análisis de expresión diferencial aunque debe considerarse que a veces las diferencias observadas por el análisis 2D-DIGE no tienen lugar en la mancha proteica más representada sugiriendo que cambios relacionados con modificaciones post traduccionales (fosforilaciones, glicosilaciones), proteólisis (activación del complemento, procesos de coagulación), etc. no afectan a la expresión total de la proteína. Sin embargo, en pacientes afectados por AR han sido descritos desórdenes en el metabolismo lipídico, con un mayor riesgo vascular por aterosclerosis sugiriendo una relación entre la inflamación y los lípidos [25]. Además ha sido descrito el papel inhibitorio que la proteína Apo AI desempeña en plasma limitando la interacción y activación entre linfocitos T y monocitos, influyendo entonces con posteriores procesos inmunológicos [26]. También ha sido observado que un descenso en los niveles plasmáticos de Apo AI en un estado de inflamación aguda puede ser un síntoma del desarrollo de un evento crónico de inflamación [27].

Mediante ELISA se determinaron en suero los niveles de dos proteínas de fase aguda, SAA y Ficolin-1. Esta determinación no permitió confirmar las diferencias halladas en el análisis 2D-DIGE aunque en ambos casos la tendencia observada en los niveles entre los grupos comparados era igual para el análisis 2D-DIGE y la medida por ELISA. Sin embargo, aumentando el nº de muestras para los ratones WT y CD38ko inmunizados con Col.II+CFA permitió establecer diferencias entre estos dos grupos de ratones. Para ambas proteínas, se observaron diferencias significativas cuando las muestras eran agrupadas en función de si eran WT o CD38ko o si se agrupaban en función del grado de afectación clínica (AIC+ vs AIC -). Los valores superiores de esta proteína para ambos casos sugieren un mayor componente inflamatorio en suero para los ratones WT (que resultan más afectados por la artritis inducida que los CD38ko) y, como podía ser esperado, en los ratones que desarrollaban artritis frente a los que no. De forma destacada, los niveles de la proteína SAA a las 3 semanas desde la 1ª inmunización cuando los datos se agrupan en función del grado de afectación (AIC+ vs AIC -) no reflejan diferencias entre los dos grupos existiendo un incremento respecto a los valores basales o de ratones sin inmunizar. Comparando estos valores de la semana 3ª con los hallados en la 6ª se observa cómo sólo en los ratones que van a desarrollar artritis a tiempo final los

niveles de SAA se mantienen altos mientras que en los AIC – se produce una reducción.

Los niveles elevados de SAA en los ratones que desarrollan artritis tienen relevancia y concuerda con lo descrito en varias situaciones sobre el papel de SAA. Esta proteína pertenece a una familia de apolipoproteínas con expresión basal pero que ante situaciones de inflamación sus niveles pueden elevarse de forma considerable. Funcionalmente participa en el transporte de colesterol, en el reclutamiento de células del sistema inmunitario hacia los focos de inflamación y por la inducción de enzimas para la degradación de la matriz extracelular. En varios trabajos se ha descrito el papel de SAA en varias patologías inflamatorias crónicas como amiloidosis, aterosclerosis y AR [28, 29]. Además, comparada con los marcadores ESR y CRP, la proteína SAA correlaciona de forma más precisa con la situación patológica de la artritis inflamatoria [30]. Por parte de la Ficolina-1, en ratón ha sido descrita su síntesis en el hígado y bazo para su secreción a la sangre [31]. Funcionalmente se ha identificado como un elemento clave de la inmunidad innata al participar en el reconocimiento de patógenos y en la activación de la cascada del complemento [32]. El hallazgo de niveles superiores en suero de esta proteína en los ratones AIC+ frente a los AIC- inmunizados con Col.II+CFA puede reflejar una mayor inducción del sistema del complemento frente a la inmunización con consecuencias en el establecimiento de un estado inflamatorio con consecuencias finales de agravamiento en el desarrollo de la artritis inducida.

A la 6ª semana desde la primera inmunización con Col II+CFA se llevó a cabo la determinación de ciertas citoquinas en el suero de ratones B6 WT y CD38ko inmunizados para conocer si a nivel sistémico en suero el nivel de citoquinas tenía correspondencia con la diferente respuesta a la inmunización con colágeno encontrada entre estos ratones. Comparando ambos tipos de ratón se encontró un aumento significativo en los ratones WT frente a los Cd38<sup>-/-</sup> de la citoquina proinflamatoria IL1- $\beta$ , y también se encontraba aumentada la citoquina proinflamatoria IL-6 mientras que los niveles de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 y MCP-1 eran muy similares entre ambos grupos. Por otro lado, en los ratones Cd38<sup>-/-</sup> aparecía aumentada la citoquina antiinflamatoria IL-4. Estas diferencias entre las citoquinas de los ratones WT y Cd38<sup>-/-</sup> presenta bastante concordancia con los niveles de estas citoquinas en articulaciones medidos por RT-PCR en el trabajo que describe el modelo de CD38ko sobre la artritis inducida [1].

El incremento de estas citoquinas en el suero de los ratones WT en comparación con los CD38 podría indicar cómo en la semana 6 desde el inicio de la inmunización a nivel sistémico se mantiene un cierto status inflamatorio que podría ayudar al desarrollo de las lesiones óseas acontecidas a nivel de articulación. La citoquina IL-1 $\beta$  ha sido encontrada en el suero de pacientes con AR y con correlación respecto al estado de la patología. Además, la importancia de esta citoquina en el desarrollo de la artritis queda de manifiesta en modelos de AIC donde ratones deficientes para esta citoquina presenta una reducida severidad de la artritis [33]. La IL-6 también ha sido detectada en el sinovio de pacientes con AR y tiene gran importancia en proliferación celular y la producción de anticuerpos [34]. En ratones deficientes para IL-6 se ha observado cómo no se desarrolla la la artritis inducida por colágeno [35]. La importancia de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en el desarrollo de la artritis queda de manifiesto al haber sido diana para el desarrollo de diversas terapias para la AR. En los ratones CD38ko, el incremento de la citoquina antiinflamatoria IL-4 podría influir, el menos en parte a la artritis inducida menos severa que en los WT. Se ha descrito la capacidad de IL-4 para inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias por monocitos e inducir la liberación de factores antiinflamatorios como antagonistas para IL-1R o receptores solubles para TNF- $\alpha$  [36]. En modelos animales se ha descrito el papel de la IL-4 en la progresión de la AR ya que la ausencia de esta citoquina provoca un aumento en la severidad de la patología [37].

Mediante citometría flujo se llevó a cabo un seguimiento durante el proceso de inducción de la artritis de ciertas poblaciones celulares que pudieran estar implicadas en su desarrollo o contribuir a la diferente respuesta entre los ratones CD38ko y B6 WT. Por medio de los marcados GR1, CD11b y CCR2 definimos una población de células que caracterizada según GR1<sup>-lo</sup> CD11b<sup>hi</sup> CCR2<sup>hi</sup> podría identificarse como monocitos inflamatorios, otra población definida como GR1<sup>hi</sup> CD11b<sup>+</sup> CCR2<sup>hi</sup> que podrían corresponderse con neutrófilos y una población GR1<sup>int</sup> CD11b<sup>+</sup> CCR2<sup>hi</sup> que según los marcadores GR1 y CD1b serían celulares inmaduras de origen mieloide.

A los 20 días desde la 1<sup>a</sup> inmunización para las poblaciones GR1<sup>-lo</sup> CD11b<sup>hi</sup> y GR1<sup>hi</sup> CD11b<sup>+</sup> se observó en el bazo de los ratones CD38ko un aumento en el n<sup>o</sup> de células respecto a lo observado en los WT. Considerando para las tres poblaciones las que eran CCR2<sup>hi</sup>, se observó un aumento de estas células en CD38ko frente a WT para los monocitos y células mieloide inmaduras. Para la misma situación, la no observación de diferencias significativas en médula ósea y sangre periférica en la comparación entre WT y CD38ko para las mismas poblaciones celulares podría indicar un problema más relacionado con la migración de células que un efecto de incremento

de la mielogénesis. Este incremento en el nº de células en el bazo de los ratones CD38ko inmunizados en comparación con los WT debido a defectos en la movilización celular es una hipótesis bastante plausible considerando los trabajos publicados en los que se demuestra cómo la pérdida de CD38 provoca una mayor susceptibilidad de los ratones a infecciones bacterianas al afectar a la quimiotaxis de los neutrófilos [12]. En estos trabajos se demuestra cómo los neutrófilos de ratones CD38ko son incapaces de migrar al sitio de la infección en respuesta a fMLP debido a que esta quimiotaxis es dependiente de la movilización de calcio mediada por cADPR. Estos defectos de migración también fueron observados en células dendríticas maduras CD38ko de forma que fue determinada la dependencia en la producción de cADPR y la movilización de los reservorios de calcio para la movilización de estas células en respuesta a quimioquinas como CCL2, CCL19, CCL21 y CXCL12 [13]. Al ser CCR2 un marcador de células con carácter inflamatorio, los defectos en la movilización de estas células en los ratones CD38ko durante el curso de la inflamación podrían ser un elemento determinante, al menos en parte, de la inducción de una respuesta inflamatoria con consecuencias negativas para el desarrollo de una respuesta ante la inmunización con colágeno.

A la semana 6ª, las poblaciones estudiadas de monocitos, neutrófilos y células mieloides inmaduras se encontraron aumentadas en médula ósea de ratones WT en comparación con los CD38ko. El aumento celular en médula ósea podría tener implicaciones sobre el mayor desarrollo de la respuesta ante la inmunización en los ratones WT de manera que se mantiene la producción de células que contribuyen al mantenimiento de la respuesta e infiltrado celular a las articulaciones y son una potencial fuente de precursores de osteoclastos que en articulaciones ante un entorno favorable contribuyan en último lugar al daño óseo y tisular. Este aumento significativo también tiene lugar dentro de estas poblaciones para las células que son positivas para CCR2<sup>hi</sup>. Este hecho puede implicar la producción de células de carácter inflamatorio que contribuyen a mantener la situación inflamatoria sistémica y local en las articulaciones con resultado de una mayor respuesta inmunitaria en los ratones WT frente a los CD38ko. En ratones CCR2ko se han descrito defectos en la migración de monocitos /macrófagos [38, 39] y cómo el bloqueo de este receptor con anticuerpos específicos consigue alterar el reclutamiento de monocitos al lugar de inflamación [40].

También se realizó un seguimiento de monocitos inflamatorios en relación con la expresión de CD184, siendo esta población caracterizada en este caso como Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup>. Al igual como sucede para los estudios anteriores, se observa a los 20 días en el bazo de los ratones CD38ko un aumento significativo de las células Ly6C<sup>hi</sup> Ly6G<sup>-</sup>

CD184<sup>+</sup> sin correspondencia en médula ósea y sangre para los 20 días mientras que a la semana 6<sup>a</sup> en médula ósea se observa un incremento de estas células en WT frente a CD38ko. CD184 (CXCR4) ha sido descrito como elemento clave para la movilización celular mediante un sistema de regulación respecto a su ligando CXCL-12 (SDF-1). La interacción entre CXCL12-CD184 tiene un papel destacable en la movilización de células mieloides y linfocíticas en médula ósea y órganos linfocitarios secundarios [14]. Además, su implicación en el desarrollo de AR ha sido demostrada al encontrarse elevados niveles de CXCL-12 en el líquido sinovial y su efecto para acelerar la angiogénesis durante el desarrollo de la AR junto con la inducción en la proliferación de enzimas degradativas del colágeno del cartílago [41-43]. Como fue comentado anteriormente los defectos en la movilización de las células CD38ko podrían implicar una respuesta desigual ante la inmunización en los ratones CD38ko frente a los WT dando como resultado una moderada severidad en la artritis inducida.

En los ratones CD38ko se ha descrito el reducido n<sup>o</sup> de células Treg e iNKT como resultado de un proceso de muerte celular inducida [44, 45]. Ante la ausencia de CD38, debido a una acumulación de NAD<sup>+</sup> se inicia un proceso de muerte celular inducida por la ADP ribosilación de los receptores purinérgicos P2X7 mediada por las enzimas Art-2 [15]. También ha sido descrito que en los ratones Cd38<sup>-/-</sup> de fondo genético C57BL/6 a diferencia de lo que ocurre en el fondo genético Nod, las células iNKT tienen un efecto de inducción sobre varias respuestas inmunológicas incluida la diferenciación de células dendríticas no tolerogénicas [46]. Tal y como ha sido descrito en el modelo de AIC para los ratones Cd38ko, como resultado de la inmunización el n<sup>o</sup> de células iNKT en el bazo de los ratones CD38ko es bastante inferior en comparación con los ratones WT [1]. En tiempos cortos también se determinó el menor n<sup>o</sup> de células iNKT en el bazo de los ratones CD38ko en comparación con los WT tras 72h de la inmunización con la molécula  $\alpha$ -GalCer. El papel del reducido n<sup>o</sup> de células iNKT en los ratones CD38ko sobre el desencadenamiento de la patología es un aspecto a seguir profundizando para evaluar exactamente el grado de implicación de estas células.

Relacionado con la modulación que las células iNKT desarrollan sobre la respuesta inmunológica innata y adaptativa mediante la activación de células dendríticas y los efectos sobre sus precursores de origen mieloide, ha sido postulado el papel que las células iNKT tienen sobre los osteoclastos al compartir los mismos precursores. Más concretamente, se ha descrito la influencia que las células iNKT tienen sobre una población de origen mieloide caracterizada como B220<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> /<sup>low</sup> CD115<sup>+</sup> CD117<sup>+</sup> cuya diferenciación hacia osteoclastos resulta más eficiente que

otras subpoblaciones de origen mieloide con distinto grado de diferenciación [16]. Esta relación de las células iNKT con la diferenciación hacia osteoclastos podría ser un posible punto de diferencia entre los ratones WT y CD38ko al presentar estos últimos un reducido nº de iNKT y una menor afectación clínica y daños óseos articulares ante la AIC. Como antes fue mencionado, la inmunización con  $\alpha$ -GalCer provocaba un aumento de células iNKT en el bazo de ratones WT frente a los CD38ko y cuando se evaluó en médula ósea la generación de la población de precursores de osteoclastos se observó un aumento en el nº de células de esta población en los ratones inyectados con  $\alpha$ -GalCer respecto a los basales y aun siendo mayor este nº en los WT inyectados con  $\alpha$ -GalCer respecto a los CD38ko las diferencias no resultaban significativas. Además, cuando se evaluó esta población de células precursoras de osteoclastos en médula ósea durante el proceso de inmunización con Col.II+CFA a distintos tiempos, se observó que a la semana 6ª existía un mayor nº de esta población en los WT respecto a los CD38ko. Tras esta observación y la determinada tras la inyección con  $\alpha$ -GalCer parece que el mayor nº de precursores de osteoclastos observado en médula ósea en WT frente a CD38ko podría tener más relación con una mayor mielogénesis observada en los ratones WT en comparación con los CD38ko tal y como era observado en médula a la semana 6ª, por ejemplo, para la población GR1int CD11b+ que seguía un comportamiento similar a la descrita para los precursores de osteoclastos. Así, el papel observado de las iNKT sobre la diferenciación hacia osteoclastos, al menos en cuanto a la generación de estos precursores en médula ósea, parece ser limitado y esta posible dependencia debería ser evaluada a otros niveles, por ejemplo, en las articulaciones para determinar si la ausencia de las células iNKT en los ratones CD38ko tiene efectos sobre el metabolismo óseo y explicar el menor daño ante la AIC.

Como resultado del desarrollo de la artritis inducida por colágeno, se ha descrito en el trabajo de Postigo y col. cómo los ratones WT presentaban una mayor afectación ósea que los ratones CD38ko que se asociaba además con una reducida severidad clínica en el caso de los CD38ko. Experimentos in vitro partiendo de células de médula ósea para la diferenciación hacia osteoclastos mediante M-CSF y RANKL nos permitió determinar cómo los ratones CD38ko presentaban una mayor capacidad de diferenciación hasta respecto a los WT ya fuese a partir de células de ratones sin inmunizar o de células de ratones inmunizados con Col.II+CFA. En varios trabajos publicados, el laboratorio de M. Zaidi ha estudiado el papel que CD38 tiene en el metabolismo óseo. Uno de los productos de la actividad enzimática de CD38, la cADPR ha sido descrita como un elemento que potencia la actividad osteoclástica [18]

aunque inicialmente pensaron que tenía un papel inhibitor en la osteoclastogénesis como resultado de la movilización de las reservas de calcio tras su producción [17]. Se ha descrito entonces que es la ADPR, principal producto de la actividad de CD38 la que actuaría como potenciador de la actividad de los osteoclastos [18]. Además, el mismo laboratorio ha descrito cómo los ratones Cd38<sup>-/-</sup> en comparación con ratones normales presentan a los tres meses de edad una reducida densidad ósea en fémur, tibia y médula espinal, a los 4 meses en la médula espinal y sobre los 5 meses de edad la densidad ósea se equipara a la de los ratones normales.

Aunque con estos antecedentes podría deducirse que ante la inducción de la artritis los ratones CD38ko desarrollarían mayores lesiones óseas, algunos aspectos podrían explicar el contrario resultado observado. Respecto a los experimentos de diferenciación in vitro hacia osteoclastos, ha sido postulado que la presencia durante la diferenciación de células CD38+ distintas a los precursores de osteoclastos pudieran provocar la generación de ADPR y provocar una reducción en la osteoclastogénesis [18]. En nuestro caso, previamente a la siembra en placa de las células de médula ósea se realiza una selección de las células a sembrar mediante la incubación *overnight* de estas células con M-CSF de manera que, al día siguiente, para intentar reducir la contaminación de células que pudieran influir negativamente en el proceso se seleccionan únicamente las células adherentes.

Durante el proceso de inmunización se realizó un seguimiento de la expresión de la enzima CD157, miembro de la familia de CD38, de manera que se determinó cómo a la semana 6<sup>a</sup> se producía un aumento en la expresión de CD157 en los ratones CD38ko frente a los WT. Como en los ratones CD38ko de 5 meses la densidad ósea se iguala a la de ratones normales, es posible que en esa edad se produzca un aumento en CD157 similar al observado durante el proceso de inmunización con objeto de compensar la falta de CD38 y se igualaría la actividad osteoclástica en los ratones. Además, durante el proceso de inmunización con Col II+CFA se observó a la semana 6<sup>a</sup> cómo en médula ósea en los ratones WT respecto a los CD38 existía un aumento de la población de células precursoras de osteoclastos (B220<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> /<sup>low</sup> CD115<sup>+</sup> CD117<sup>+</sup>) y células mieloides que podrían ser potenciales precursores de osteoclastos y dar lugar a la desigual afectación ósea como resultado de la inducción de la artritis. Relacionado con esto, los defectos en los ratones CD38 en la movilización y migración de células ante ciertos estímulos podría también influir sobre la movilización celular hacia las articulaciones con el desigual resultado sobre la osteoclastogénesis [13]; la existencia local de un entorno favorable para la formación de osteoclastos podría resultar más determinante que una mayor capacidad de

diferenciación in vitro en los ratones CD38ko respecto a los WT. Como resultado de la inmunización, a nivel de articulaciones es posible que ciertos estímulos aún por determinar pudieran incrementar la actividad ciclasa de CD38 o CD157 para la producción de cADPR que actuaría potenciando la formación de osteoclastos.





# Referencias

1. Postigo, J., et al., *Mice deficient in CD38 develop an attenuated form of collagen type II-induced arthritis*. PLoS One, **2012**. 7(3): p. e33534.
2. Guerrier, L., et al., *Reduction of dynamic protein concentration range of biological extracts for the discovery of low-abundance proteins by means of hexapeptide ligand library*. Nat Protoc, **2008**. 3(5): p. 883-90.
3. Jansen, FH., et al., *Exosomal secretion of cytoplasmic prostate cancer xenograft-derived proteins*. Mol Cell Proteomics, **2009**. 8(6): p. 1192-205.
4. Martinez-Amat, A., et al., *Release of alpha-actin into serum after skeletal muscle damage*. Br J Sports Med, **2005**. 39(11): p. 830-4.
5. Zoeger, A., et al., *Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells*. Clin Chem, **2006**. 52(11): p. 2079-86.
6. Yang, TL., et al., *The structure and function of murine factor V and its inactivation by protein C*. Blood, **1998**. 91(12): p. 4593-9.
7. Mural, RJ., et al., *A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome*. Science, **2002**. 296(5573): p. 1661-71.
8. von Toerne, C., et al., *ApoE, Mbl2, and Psp plasma protein levels correlate with diabetic phenotype in NZO mice--an optimized rapid workflow for SRM-based quantification*. J Proteome Res, **2013**. 12(3): p. 1331-43.
9. Schurgers, E., et al., *Pulmonary inflammation in mice with collagen-induced arthritis is conditioned by complete Freund's adjuvant and regulated by endogenous IFN-gamma*. Eur J Immunol, **2012**. 42(12): p. 3223-34.
10. Billiau, A., et al., *Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases*. J Leukoc Biol, **2001**. 70(6): p. 849-60.
11. Young, MR., et al., *Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors*. Cancer Res, **1987**. 47(1): p. 100-5.
12. Partida-Sanchez, S., et al., *Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo*. Nat Med, **2001**. 7(11): p. 1209-16.
13. Partida-Sanchez, S., et al., *Regulation of dendritic cell trafficking by the ADP-ribosyl cyclase CD38: impact on the development of humoral immunity*. Immunity, **2004**. 20(3): p. 279-91.
14. De Klerck, B., et al., *Pro-inflammatory properties of stromal cell-derived factor-1 (CXCL12) in collagen-induced arthritis*. Arthritis Res Ther, **2005**. 7(6): p. R1208-20.
15. Seman, M., et al., *NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor*. Immunity, **2003**. 19(4): p. 571-82.
16. Jacome-Galarza, CE., et al., *Identification, characterization, and isolation of a common progenitor for osteoclasts, macrophages, and dendritic cells from murine bone marrow and periphery*. J Bone Miner Res, **2013**. 28(5): p. 1203-13.
17. Sun, L., et al., *Disordered osteoclast formation and function in a CD38 (ADP-ribosyl cyclase)-deficient mouse establishes an essential role for CD38 in bone resorption*. FASEB J, **2003**. 17(3): p. 369-75.
18. Iqbal, J., et al., *Extracellular NAD+ metabolism modulates osteoclastogenesis*. Biochem Biophys Res Commun, **2006**. 349(2): p. 533-9.
19. Inglis, JJ., et al., *Protocol for the induction of arthritis in C57BL/6 mice*. Nat Protoc, **2008**. 3(4): p. 612-8.
20. Manicourt, D., et al., *Plasma and urinary levels of beta2 microglobulin in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, **1978**. 37(4): p. 328-32.

21. Schardijn, GH., et al., *Beta 2-microglobulin: its significance in the evaluation of renal function*. *Kidney Int*, **1987**. 32(5): p. 635-41.
22. Druke, TB. *Beta2-microglobulin and amyloidosis*. *Nephrol Dial Transplant*, **2000**. 15 Suppl 1: p. 17-24.
23. Heegaard, NH. *beta(2)-microglobulin: from physiology to amyloidosis*. *Amyloid*, **2009**. 16(3): p. 151-73.
24. Freeman, MR. *Beta2 microglobulin: a surprising therapeutic target for prostate cancer and renal cell carcinoma*. *J Urol*, **2007**. 178(1): p. 10-1.
25. Choy, E., et al., *Interpreting lipid levels in the context of high-grade inflammatory states with a focus on rheumatoid arthritis: a challenge to conventional cardiovascular risk actions*. *Ann Rheum Dis*, **2009**. 68(4): p. 460-9.
26. Hyka, N., et al., *Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes*. *Blood*, **2001**. 97(8): p. 2381-9.
27. Burger, D., et al., *High-density lipoprotein-associated apolipoprotein A-I: the missing link between infection and chronic inflammation?* *Autoimmun Rev*, **2002**. 1(1-2): p. 111-7.
28. Migita, K., et al., *Serum amyloid A protein stimulates CCL20 production in rheumatoid synoviocytes*. *Rheumatology (Oxford)*, **2009**. 48(7): p. 741-7.
29. Zhang, N., et al., *Serum amyloid A-luciferase transgenic mice: response to sepsis, acute arthritis, and contact hypersensitivity and the effects of proteasome inhibition*. *J Immunol*, **2005**. 174(12): p. 8125-34.
30. Cunnane, G., et al., *Serum amyloid A in the assessment of early inflammatory arthritis*. *J Rheumatol*, **2000**. 27(1): p. 58-63.
31. Endo, Y., et al., *The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity*. *Int J Biochem Cell Biol*, **2011**. 43(5): p. 705-12.
32. Matsushita, M. *Ficolins in complement activation*. *Mol Immunol*, **2013**. 55(1): p. 22-6.
33. Saijo, S., et al., *Suppression of autoimmune arthritis in interleukin-1-deficient mice in which T cell activation is impaired due to low levels of CD40 ligand and OX40 expression on T cells*. *Arthritis Rheum*, **2002**. 46(2): p. 533-44.
34. Zwerina, J., et al., *Pathogenesis of rheumatoid arthritis: targeting cytokines*. *Ann N Y Acad Sci*, **2005**. 1051: p. 716-29.
35. Wong, PK., et al., *Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis*. *Arthritis Rheum*, **2006**. 54(1): p. 158-68.
36. Hart, PH., et al., *Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10*. *J Immunol*, **1996**. 157(8): p. 3672-80.
37. Finnegan, A., et al., *IL-4 and IL-12 regulate proteoglycan-induced arthritis through Stat-dependent mechanisms*. *J Immunol*, **2002**. 169(6): p. 3345-52.
38. Boring, L., et al., *Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice*. *J Clin Invest*, **1997**. 100(10): p. 2552-61.
39. Kuziel, WA., et al., *Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1997**. 94(22): p. 12053-8.
40. Maus, U., et al., *The role of CC chemokine receptor 2 in alveolar monocyte and neutrophil immigration in intact mice*. *Am J Respir Crit Care Med*, **2002**. 166(3): p. 268-73.
41. Kanbe, K., et al., *Stimulation of matrix metalloprotease 3 release from human chondrocytes by the interaction of stromal cell-derived factor 1 and CXC chemokine receptor 4*. *Arthritis Rheum*, **2002**. 46(1): p. 130-7.
42. Nanki, T., et al., *Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium*. *J Immunol*, **2000**. 165(11): p. 6590-8.

43. Pablos, JL., et al., *Synoviocyte-derived CXCL12 is displayed on endothelium and induces angiogenesis in rheumatoid arthritis*. J Immunol, **2003**. 170(4): p. 2147-52.
44. Chen, J., et al., *Targeted disruption of CD38 accelerates autoimmune diabetes in NOD/Lt mice by enhancing autoimmunity in an ADP-ribosyltransferase 2-dependent fashion*. J Immunol, **2006**. 176(8): p. 4590-9.
45. Chen, YG., et al., *CD38 is required for the peripheral survival of immunotolerogenic CD4+ invariant NK T cells in nonobese diabetic mice*. J Immunol, **2006**. 177(5): p. 2939-47.
46. Driver, JP., et al., *Invariant natural killer T-cell control of type 1 diabetes: a dendritic cell genetic decision of a silver bullet or Russian roulette*. Diabetes, **2010**. 59(2): p. 423-32.



*Conclusiones*



## Conclusiones

1. El fraccionamiento del suero mediante el empleo de librerías de hexapéptidos (conocidas con el nombre *Proteominer*) permite la detección de proteínas en un rango de concentración medio y bajo que posteriormente en estudios de expresión diferencial mediante 2D-DIGE resultan con significancia entre ratones WT y CD38ko afectados por la artritis inducida.
2. El análisis mediante 2D-DIGE del suero de ratones WT y CD38ko entre ratones inmunizados con Col.II+CFA permite determinar un grupo de proteínas con expresión diferencial relacionadas con inflamación, apolipoproteínas y complemento. El análisis multivariante mediante análisis de componentes principales sobre estas proteínas expresadas diferencialmente entre los ratones inmunizados con Col.II+CFA permiten establecer perfiles proteicos de expresión en función del tipo de ratón que se trate y del grado de afectación en los ratones de la artritis inducida.
3. Estudios proteómicos de expresión diferencial mediante 2D-DIGE en ratones tratados con CFA/IFA permitieron evaluar la implicación del adyuvante empleado sobre la determinación de proteínas expresadas diferencialmente entre ratones inmunizados con Col.II+CFA. Como resultado se pudo determinar una serie de proteínas cuyos cambios de expresión se debían a la respuesta ante la inmunización con el colágeno II sin aparente implicación del adyuvante empleado.
4. Mediante ensayos de ELISA y Western Blot se ha confirmado las diferencias de expresión encontradas para algunas proteínas como IgG, la proteína sérica amiloide (SAA) o Ficolina-1 cuyos niveles de expresión entre los grupos estudiados correlacionan con el grado de respuesta ante la inmunización con colágeno II.
5. Como resultado de la inmunización se han caracterizado una serie de poblaciones celulares en monocitos y células de origen mieloide mediante el marcador CCR2 cuya inducción y proliferación resulta mayor en los ratones WT



frente a los CD38ko, consistente con la desigual susceptibilidad al desarrollo de la artritis reumatoide inducida.

6. El bajo porcentaje de células iNKT en los ratones CD38ko ante la inmunización con Col.II o la activación con  $\alpha$ Gal-Cer podría ser determinante para el desarrollo de la artritis inducida debido al efecto inductor de la respuesta inmunitaria descrito en la bibliografía para estas células en el fondo genético C57BL/6 (B6).
7. Los ratones CD38ko a nivel basal o inmunizados con Col. II presentan una mayor capacidad de diferenciación *in vitro* hacia osteoclastos no consecuente con la menor susceptibilidad de estos ratones al desarrollo de la artritis inducida y los daños óseos consecuencia de la patología. Una mayor expresión de la enzima CD157 en las articulaciones de los ratones CD38ko a la semana 6ª tras la inmunización pudiera explicar un mecanismo compensatorio ante la falta de la actividad desarrollada por CD38.

# *Anexo I*

*Concentraciones séricas o plasmáticas de las proteínas identificadas en muestras de suero tras fraccionamiento con Proteominer.*



Identificación	Accesion number	Spots PMF	Spots MS/MS	Comentarios	Abundancia
39S ribosomal protein L39, mitochondrial	Q9JKF7	1		Mitochondrial	No disponible
Actina	Q6ZWM3 or P63260	2		0.6 mg/ml (humanos)	PCB
Alpha 1 anti-tripsina 1-3 or 1-1	Q00896 y P07758	2		1.2 ± 0.2 mg/ml	PAC
Alpha-1B-glicoproteína	Q19LI2	3		0.22 mg/ml (humanos) USCN	PCM
Alpha-2-HS-glicoproteína	P29699	1		600 µg/ml	PCM
Antitrombina-III	P32261	9	1	313 µg/ml	PCM
Apolipoproteína A-I	Q00623	6	4	1.27-1.47 mg/ml (humanos)	PAC
Apolipoproteína A-II	P09813	1		106 µg/ml. J Lipid Res 2007	PCB
Apolipoproteína E	P08226	3	3	35 µg/ml: 1 mancha proteica corresponde con una isoforma de menor peso molecular: gi 148691233	PCB
Apolipoproteína A-IV	P06728		1	111 ± 27 µg/ml (humanos) Clin Chim Acta. 1987 Aug 31;167(3):303-11.	PCB
CD200R3	Q9D642	1		Proteína Transmembrana. Expresion en células mieloides y otros tipos celulares. Señalización inhibitoria	No disponible
CD5 antigen-like	Q9QWK4	5		200 ng/ml en cirrosis	PCB
Ceruloplasmina	Q61147	1		261 ± 5.2 µg/ml	PCM
Clusterina	Q06890	7	1	10 µg/ml (mouse); 4 manchas proteicas para cadena alpha, 3 para cadena beta(PMF). Para MS/MS a la cadena b	PCB
Factor Coagulación V	O88783		1	50 kDa (cofactor inactivado) Blood 1998, 91: 4593. 6.6 mg/ml como procofactor (humanos) Blood 2003, 101: 20	PAC; No disponible
Complemento C1q subcomponente subunidad B	P14106	1		61.97 ± 10.50 µg/ml (humanos); BMC Nephrology 2013, 14:63	MAP
Complemento C3	P01027	1	1	Se corresponde con C3b aa 25-666; C3: 1-2 mg/ml	PAC
Complemento C4b	P01029	2	5	200-500 µg/ml; estas manchas proteicas corresponden con diferentes subunidades de C4-B o fragmentos	PCM
Complemento Factor H	P06909	2		263 mg/ml (humanos)	PCM
Complemento Factor H-related protein B	gi 71361676	4		39.1 kDa; Q61406 (CFHR1, ratón)	
Complemento Factor H-related protein C	gi 113926782	1		102.6 kDa; 25 µg/ml (humanos)	PCB
Complemento Factor H-related protein C	gi 113926784	1		95.8 kDa; 25 µg/ml (humanos)	PCB
Fibronectina	P11276	1		300-400 µg/ml. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006, 26: 1193-1195.	PCM
Ficolina-1	O70165	3		0.5 µg/ml niveles basales. Identificada además por WB con Ac policlonal anti-Ficolina A (Endo)	PCB
GAPDH	Q569X5	1		11 ± 8 mIU/ml; 2-20 ng/ml?	PCB
Glutación peroxidasa 3	P46412	3	1	24-29 µg/ml (plasma humano)	PCB
H-2 class I histocompatibility antigen, Q10 alpha chain	P01898	1		Proteína de membrana	No disponible
Hemoglobina subunidad alpha	P01942	1	2	10-40 µg/ml (hemoglobina en plasma, humanos)	PCB
Hemoglobina subunidad beta1	P02088	1	1	10-40 µg/ml (hemoglobina en plasma, humanos)	PCB
Ig alpha chain C region	P01878		1	2 mg/ml como IgA	PAC
Ig gamma-2B chain C region	P01867	2	1	11 mg/ml como IgG	PAC
Ig kappa chain C region	P01837	6	4	0.9-11 mg/ml como IgM, IgG, IgA	PAC
Ig lambda-2 chain C region	P01844	1		0.9-11 mg/ml como IgM, IgG, IgA	PAC
Ig lambda-1 chain C region	P01843		1	0.9-11 mg/ml como IgM, IgG, IgA	PAC
Ig mu chain C region secreted form	P01872	4	2	0.9-1 mg/ml como IgM, IgG, IgA	PAC
Kininogeno-1	Q08677	1		83 µg/ml	PCB
Major urinary protein 20	Q5FW60		1	2-60 mg/ml en suero de ratones B6	PCB
Major urinary protein 5_TPA_inf	gi 206725617	1		2-60 µg/ml en suero de ratones B6	PCB
Proteína C de unión a manosa	P41317	1		45 mg/ml suero de ratón	PCB
Fosfatidilinositol-glican-especifico fosfolipasa D	O70362		1	468 ± 99 µg/ml	PCM
Plasminógeno	P20918	4		70 µg/ml (plasma ratones B6) JCI 2002.	PCB
Proteasoma subunidad alpha tipo-1	Q9R1P4	1		10 ng/ml (ratones normales) hasta 20 µg/ml (con tumores sólidos) Proteasoma 20S	PCB
Proteasoma subunidad alpha tipo-2	P49722	1		10 ng/ml (ratones normales) hasta 20 µg/ml (con tumores sólidos) Proteasoma 20S	PCB
Proteasoma subunidad alpha tipo-4	Q9R1P0	1		10 ng/ml (ratones normales) hasta 20 µg/ml (con tumores sólidos) Proteasoma 20S	PCB
Proteasoma subunidad alpha tipo-6	Q9QUM9		1	10 ng/ml (ratones normales) hasta 20 µg/ml (con tumores sólidos) Proteasoma 20S	PCB
Proteasoma subunidad alpha tipo-1	O09061	1		10 ng/ml (ratones normales) hasta 20 µg/ml (con tumores sólidos) Proteasoma 20S	PCB
Proteasoma subunidad alpha tipo-3	Q9R1P1		1	10 ng/ml (ratones normales) hasta 20 µg/ml (con tumores sólidos) Proteasoma 20S	PCB
Proteasoma subunidad alpha tipo-8	P28063	1		10 ng/ml (ratones normales) hasta 20 µg/ml (con tumores sólidos) Proteasoma 20S	PCB
Proteína fosfatasa 1G	Q61074		1	Nuclear	No disponible
Protrombina	P19221	1	1	110 µg/ml	PCM
Recoverina	P34057	1		Células fotorreceptoras conos y bastones	No disponible
Serotransferrina	Q63915	5	1	1.7-3.5 mg/ml	PAC
Albumina Sérica	P07724	3	3	37-47 mg/ml; 3ª opción PMF spot 517	PAC
Proteína Sérica Amiloide A1	P05366		1	rango 5-30 mg/ml	PCB
Proteína Sérica Amiloide A2	P05367		1	rango 5-30 mg/ml	PCB
					No disponible

Identificación	Accesion number	Spots PMF	Spots MS/MS	Comentarios	Abundancia
Transtiretina	P07309	1		230-450 µg/ml	PCM
Tropomiosina alpha-4 chain	Q6IRU2	1		Citoplasma/citoesqueleto	No disponible
Tubulina beta-4B chain	P68372	1		Citoplasma/citoesqueleto	No disponible
Proteína de unión a Vitamina D	P21614	2		340 ± 35 µg/ml; J Proteome Res 2007, 6: 993	PCM
<b>60 proteínas distintas en total</b>		<b>105 (48)</b>	<b>42 (26)</b>		

PAC: Proteínas en Alta Concentración (rango 1-100 mg/ml)

PCM: Proteínas de Concentración Media (rango 0.1-1 mg/ml)

PCB: Proteínas de Concentración Baja (inferior a 100 µg/ml)

CFHR1 humano : 70-100 ug/ml (Heinen et al. Blood 2009; 114: 2439-2447)

CFHR4A humano (86 kDa); 25 ug/ml (Hebecker & Jozsi. J Biol Chem. 2012;287(23):19528-36).

CFHR5 (3-10 ug/ml, *Vernon et al.* Am J Kidney Dis. 2012;60(1):121-5).

33 proteínas sólo por MS; 13 proteínas sólo por MS/MS; 16 proteínas por ambos métodos MS y MS/MS

# *Anexo II*

*Tabla de proteínas identificadas mediante MS.*



Código	Identificación	Número de acceso	Pm (teórico)	pl (teórico)	Score	Decoy	Expect	Sequence coverage	Queries matched	Queries searched
45	Complemento factor H	P06909	139047	6.67	113	35	8.30E-08	26	27	73
46	Fibronectina	P11276	272368	5.39	67	42	0.0034	8	17	33
48	Complemento factor H	P06909	139047	6.67	159	42	2.10E-12	34	33	78
89	Complemento factor H-related protein C isoform 2	gi 237757322	102552	7.62	110	38	1.40E-06	22	21	87
	Complemento factor H-related protein C	gi 113926782	102611	7.62	110	38	1.40E-06	22	21	87
	Complemento factor H-related protein C isoform 1	gi 237757318	102623	7.62	110	38	1.40E-06	22	21	87
	Complemento factor H-related protein C isoform 3	gi 237757324	95800	6.97	105	38	4.50E-06	22	20	87
90	Complemento factor H-related protein C	gi 113926784	95788	6.97	75	43	0.005	16	14	64
	Complemento factor H-related protein C isoform 3	gi 237757324	95800	6.97	75	43	0.005	16	14	64
	Complemento factor H-related protein C isoform 2	gi 237757322	102552	7.62	71	43	0.011	15	14	64
	Complemento factor H-related protein C isoform 1	gi 237757318	102623	7.62	71	43	0.011	15	14	64
92	Ceruloplasmina	Q61147	121872	5.53	61	40	0.013	11	9	28
100	Plasminógeno	P20918	90749	6.21	56	48	0.0474	19	14	59
102	Plasminógeno	P20918	90749	6.21	90	39	1.70E-05	29	19	69
103	Plasminógeno	P20918	90749	6.21	97	38	3.00E-06	22	17	50
104	Plasminógeno	P20918	90749	6.21	130	46	1.70E-09	29	23	68



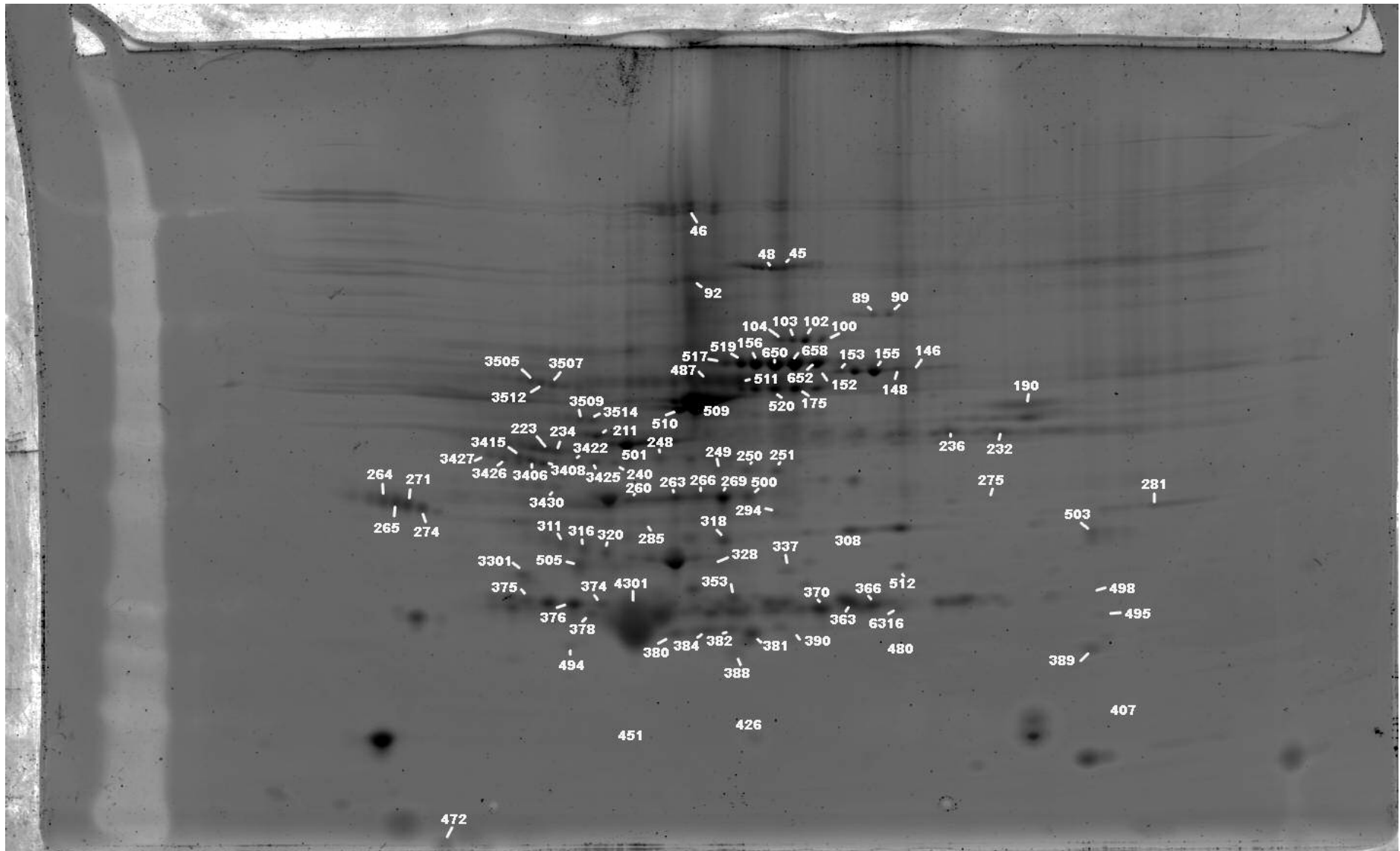
146	Serotransferrina	Q63915	76674	6.94	79	27	0.00021	19	17	60
148	Serotransferrina	Q63915	76674	6.94	149	32	2.10E-11	34	24	61
152	Serotransferrina	Q63915	76674	6.94	57	38	3.60E-02	16	13	52
153	Serotransferrina	Q63915	76674	6.94	116	25	4.20E-08	34	22	65
155	Serotransferrina	Q63915	76674	6.94	245	21	5.30E-21	44	31	48
156	Antitrombina-III	P32261	51971	6.1	133	34	8.10E-10	38	20	63
175	Antitrombina-III	P32261	52484	6.1	72	50	0.0012	25	13	70
190	Complemento C3	P01027	187905	6.29	149	30	2.10E-11	16	29	70
211	Proteína de unión a Vitamina-D	P21614	53565	5.39	100	39	1.70E-06	39	16	56
223	Alpha-1-antitripsina 1-3	Q00896	45794	5.25	56	38	0.047	11	7	27
	Alpha-1-antitripsina 1-1	P07758	45974	5.44	55	38	0.048	11	7	27
232	Ig gamma-2B chain C region	P01867	44972	6.1	56	44	4.10E-02	15	6	23
234	Alpha-1-antitripsina 1-3	Q00896	45794	5.25	56	36	0.039	16	7	28
	Alpha-1-antitripsina 1-1	P07758	45974	5.44	56	36	0.039	16	7	28
236	Ig gamma-2B chain C region	P01867	44231	6.1	58	43	0.023	29	10	59
240	Apolipoproteina A-I	Q00623	30597	5.51	57	60	0.031	29	8	38
248	Complemento factor H-related protein B precursor	gi 71361676	39105	7.96	76	37	0.004	28	8	39
249	Complemento factor H-related protein	gi 387128	53222	7.33	112	47	9.00E-07	39	15	75
250	Complemento factor H-related protein B	gi 71361676	39105	7.96	76	42	3.90E-03	29	10	63
251	Complemento factor H-related protein B	gi 71361676	39105	7.96	72	46	0.0099	32	10	75

260	Actina, citoplasmática 1	Q6ZWM3	42052	5.29	79	33	0.0002	24	8	27
	Actina, citoplasmática 2	P63260	42108	5.31	79	33	0.0002	24	8	27
263	Actina, citoplasmática 1	Q6ZWM3	41710	5.29	66	50	0.0039	29	9	44
	Actina, citoplasmática 2	P63260	41766	5.31	66	50	0.0039	29	9	44
264	Clusterina	Q06890	51623	5.46	61	34	0.012	15	8	31
265	Clusterina	Q06890	51623	5.46	69	34	0.002	26	17	100
266	Ficolina-1	O70165	36275	6.06	68	38	0.0026	19	10	58
							2.10E-			
269	Ficolina-1	O70165	36846	6.06	99	34	06	25	12	57
271	Clusterina	Q06890	51623	5.46	61	22	0.012	21	10	55
274	Clusterina	Q06890	51623	5.46	56	34	0.044	15	7	26
275	Cell surface glycoprotein CD200 receptor 3	Q9D642	34116	8.55	56	31	0.045	21	8	43
							1.70E-			
281	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Q569X5	36072	8.44	100	30	06	49	14	100
285	Recoverina	P34057	23392	5.06	61	56	0.014	26	6	28
294	Ficolina-1	O70165	36846	6.06	66	42	0.0038	22	10	72
308	Complemento C4-B	Q62353	192794	7.38	56	34	0.044	10	23	56
311	Clusterina	Q06890	52250	5.46	60	40	0.016	13	7	45
316	Clusterina	Q06890	52250	5.46	61	30	0.014	14	8	60
318	Apolipoproteína E	P08226	35844	5.56	56	43	0.047	33	12	73
320	Clusterina	Q06890	51623	5.46	75	42	0.00054	22	9	29
							2.30E-			
328	Apolipoproteína E	P08226	35901	5.56	99	36	06	40	16	76
							8.20E-			
337	Proteasoma subunidad alpha tipo-1	Q9R1P4	29813	6	103	30	07	46	13	74
353	Ig lambda -2 chain C region	P01844	11419	5.86	57	40	0.036	70	5	57
363	Ig kappa chain C region	P01837	11942	5.23	70	29	0.0016	54	8	100
366	Ig kappa chain C region	P01837	11942	5.23	58	37	0.026	63	6	70
	Ig kappa chain V-II region 26-10	P01631	12379	9.04	56	37	0.042	30	6	70
370	Ig kappa chain C region	P01837	11942	5.23	57	15	0.032	42	7	100
374	Apolipoproteína A-I	Q00623	30597	5.51	59	26	0.019	27	7	29

375	Ig kappa chain C region	P01837	11942	5.23	56	24	0.038	42	5	44
376	Ig kappa chain C region	P01837	11942	5.23	57	24	0.032	48	7	100
378	Apolipoproteína A-I	Q00623	30597	5.51	87	44	0.05	39	13	76
380	Glutación peroxidasa 3	P46412	25580	8.33	63	18	0.0083	35	9	57
381	Proteína del Complemento C4	gi 50242	128707	6.46	72	40	0.0095	8	12	32
382	Glutación peroxidasa 3	P46412	25409	8.33	59	48	0.021	29	7	30
384	Glutación peroxidasa 3	P46412	25409	8.33	75	37	0.00051	26	8	27
388	Apolipoproteína A-I	Q00623	30597	5.51	114	33	0.08	40	15	70
389	39S proteína ribosomal L39, mitocondrial	Q9JKF7	38924	8.09	58	45	0.025	30	7	35
390	Apolipoproteína A-I	Q00623	30597	5.51	108	39	0.07	40	14	57
407	Hemoglobina subunidad alpha	P01942	15076	7.96	62	38	0.01	42	6	38
426	Transtiretina	P07309	15880	5.77	58	32	0.028	45	7	85
451	Apolipoproteína E, isoforma CRA_e	gi 148691233	17696	5.2	96	44	0.05	44	11	59
	Apolipoproteína E, isoforma CRA_f	gi 148691234	27361	8.89	67	44	0.027	28	11	59
	Apolipoproteína E, isoforma CRA_a	gi 148691229	26994	4.89	74	44	0.0061	25	10	59
472	Apolipoproteína A-II	P09813	11359	6.56	60	28	0.019	50	6	40
480	Proteasoma subunidad beta tipo-8	P28063	30241	6.22	107	38	0.07	44	13	54
487	Ig mu chain C region secreted form	P01872	50625	6.56	77	43	0.0003	17	9	31
	Ig mu chain C region membrane-bound form	P01873	53121	5.98	76	43	0.00044	16	9	31
494	TPA_inf: major urinary protein 5	gi 206725617	20878	4.89	64	41	0.053	43	7	49
	major urinary protein 14 precursor	gi 317008607	20940	4.89	64	41	0.053	43	7	49
495	Proteasoma subunidad beta tipo-1	O09061	26583	7.67	57	43	0.035	27	6	28
498	Chain A, S25-2 Fab Unliganded 1 (Ig kappa dominio)	gi 42543426	24487	8.53	66	55	0.035	42	8	66
500	Ficolina-1	O70165	36846	6.06	64	50	0.0065	22	10	76

H-2 class I histocompatibility antigen, Q10										
	alpha chain	P01898	37455	5.13	59	50	0.023	28	9	76
501	Proteína de unión a Vitamina-D	P21614	55162	5.39	70	17	0.0015	25	11	65
Complemento C1q subcomponente										
503	subunidad B	P14106	26929	8.3	59	32	0.022	29	8	70
505	Proteína C de unión a Manosa	P41317	26340	4.96	57	56	0.032	25	7	47
509	Albúmina Sérica	P07724	70700	5.75	159	42	2.10E-12	33	21	70
510	Albúmina Sérica	P07724	68648	5.75	178	30	2.60E-14	41	23	46
511	Ig mu chain C region secreted form	P01872	49940	6.56	100	45	1.70E-06	31	15	59
	Ig mu chain C region membrane-bound form	P01873	52494	5.98	98	45	2.70E-06	29	15	59
512	Proteasome subunit alpha type-4	Q9R1P0	29737	7.59	64	35	3.90E-02	30	8	57
517	Antithrombina-III	P32261	51971	6.1	172	50	1.00E-13	53	22	77
	Prothrombin	P19221	70224	6.04	59	50	0.02	18	14	77
	Albúmina Sérica	P07724	68648	5.75	56	50	0.043	32	14	77
519	Antitrombina-III	P32261	51971	6.1	110	38	4.20E-12	55	28	131
520	Ig mu chain C region secreted form	P01872	50625	6.56	87	50	3.10E-05	26	13	70
	Antitrombina-III	P32261	52484	6.1	79	50	0.00019	27	14	70
650	Antitrombina-III	P32261	51971	6.1	142	26	1.00E-10	58	55	196
652	Antitrombina-III	P32261	51971	6.1	74	30	7.30E-04	26	14	65
658	Antitrombina-III	P32261	51971	6.1	113	39	8.30E-08	33	18	65

3301	Tropomiosina cadenaalpha-4	Q6IRU2	28450	4.65	58	41	0.023 1.70E-	27	7	28
3406	CD5 antigen-like	Q9QWK4	38837	5.01	110	19	07 6.00E-	53	18	100
3408	CD5 antigen-like	Q9QWK4	40320	5.01	120	24	09	33	12	30
3415	CD5 antigen-like	Q9QWK4	40320	5.01	70	18	0.018	30	10	65
3422	Tubulin beta-4B chain	P68372	50255	4.79	55	36	0.049	14	6	42
3425	Alpha-2-HS-glicoproteína	P29699	37302	6.04	60	37	0.0016	22	10	42
3426	CD5 antigen-like	Q9QWK4	40320	5.01	60	29	0.017 4.20E-	19	6	22
3427	CD5 antigen-like	Q9QWK4	38837	5.01	96	41	06 2.00E-	30	13	48
3430	Antitrombina-III	P32261	51971	6.1	119	54	08	34	14	42
3505	Alpha-1B-glicoproteína	Q19LI2	56518	6.33	76	38	0.0004	22	11	43
	Ig mu chain C region secreted form	P01872	49940	6.56	61	38	0.014	20	9	43
	Ig mu chain C region membrane-bound form	P01873	52494	5.98	59	38	0.021	19	9	43
	Proteína Stress-70 , mitochondrial	P38647	73416	5.81	57	38	0.031	16	10	43
3507	Alpha-1B-glicoproteína	Q19LI2	57202	6.33	58	23	0.025	14	7	25
3509	Kininogeno-1	O08677	73056	6.05	72	32	0.0012	16	13	48
3512	Alpha-1B-glicoproteína	Q19LI2	56518	6.33	77	44	0.00031	25	12	54
3514	Kininogeno-1	O08677	73056	6.05	63	49	0.0087	16	12	47
4301	Apolipoproteína A-I	Q00623	30597	5.51	79	23	0.0002 1.50E-	37	12	65
6316	Proteasoma subunidad alpha tipo-2	P49722	25910	6.92	90	38	05	34	10	49





# *Anexo III*

*Tabla de proteínas identificadas mediante MS/MS.*





Código	Identificación	Número de acceso	protein score	protein score CI%	pep count	total ion score	total % ion CI	Pm (teórico)	pl (teórico)		
154	Serotransferrina	Q63915	106	100	13	47	99,995	78840,5	6,94		
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification	
	878,473	878,4714	-0,0016	-2	316	323	DSAFGLLR				
	915,4682	915,4809	0,0127	14	288	295	VAQEHPGK				
	1323,5885	1323,6846	0,0961	73	373	383	CDEWSIIEGK			Carbamidomethyl (C)[1]	
	1349,6696	1349,672	0,0024	2	456	467	ASDTSITWNNLK				
	1419,7743	1419,769	-0,0053	-4	332	343	LYLGHNVYTAIR				
	1419,7743	1419,769	-0,0053	-4	332	343	LYLGHNVYTAIR	47	99,995		
	1453,7686	1453,7482	-0,0204	-14	298	310	SKDFQLFSSPLGK				
	1505,7668	1505,6696	-0,0972	-65	655	667	CFVKLPEGTPPEK			Carbamidomethyl (C)[1]	
	1539,7108	1539,75	0,0392	25	240	251	DQYELLCLDNTR			Carbamidomethyl (C)[7]	
	1650,725	1650,7397	0,0147	9	668	681	YLGAEYMQSVGNMR			Oxidation (M)[7,13]	
	1655,7668	1655,8121	0,0453	27	479	492	TAGWNIPMGMLYNR			Oxidation (M)[8,10]	
	1656,7687	1656,7915	0,0228	14	252	264	KPVDQYEDCYLAR			Carbamidomethyl (C)[9]	
	1934,9276	1934,9614	0,0338	17	573	588	NLKQDFELLCPDGTR			Carbamidomethyl (C)[11]	
	1990,8712	1990,8705	-0,0007	0	526	542	CAPNNKEEYNGYGAFR			Carbamidomethyl (C)[1]	
	176	Complemento C4-B	P01029	127	100	10	111	100	194417,2	7,38	
Calc. Mass.		Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification	
800,5352		800,5126	-0,0226	-28	1372	1378	GTLKILR				
837,4286		837,5072	0,0786	94	1719	1725	AACFQLK			Carbamidomethyl (C)[3]	
1522,786		1522,9304	0,1444	95	122	135	ATETQGVNLLFSSR				
1522,786		1522,9304	0,1444	95	122	135	ATETQGVNLLFSSR	84	100		
1614,8638		1614,9968	0,133	82	268	281	YIYGKPVQGVAYTR	27	99,661		
1614,8638		1614,9968	0,133	82	268	281	YIYGKPVQGVAYTR				
1687,9126		1688,053	0,1404	83	315	329	DQFQAALDKINIGVR				
1969,9879		1970,0358	0,0479	24	137	153	GHIFVQTDQPIYNPGQR				
2126,0889		2126,1118	0,0229	11	136	153	RGHIFVQTDQPIYNPGQR				
2190,0972		2190,0972	0	0	165	183	MRPSTDFLTITVENSHGLR			Oxidation (M)[1]	
2203,1492		2203,1421	-0,0071	-3	74	93	LSSGDDFVLLSLEVPEDVRR				
2225,1575		2225,1228	-0,0347	-16	137	155	GHIFVQTDQPIYNPGQVRV				
182		Albumina Sérica	P07724	401	100	16	296	100	70700,5	5,75	
		Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
		1019,5784	1019,5791	0,0007	1	234	242	AFKAWAVAR			
	1149,615	1149,6124	-0,0026	-2	66	75	LQVEVDFAK				
	1439,7853	1439,7938	0,0085	6	439	452	APQVSTPTLVEAAR				
	1455,8066	1455,8059	-0,0007	0	361	372	RHPDYSVLLLLR	46	99,991		
	1455,8066	1455,8059	-0,0007	0	361	372	RHPDYSVLLLLR				
	1479,7954	1479,8116	0,0162	11	422	434	LG EYGFQNAILVR				
	1479,7954	1479,8116	0,0162	11	422	434	LG EYGFQNAILVR	52	99,998		
	1609,7897	1609,7971	0,0074	5	348	360	DVFLGTFLEYYSR				
	1609,7897	1609,7971	0,0074	5	348	360	DVFLGTFLEYYSR	61	100		
	1662,8519	1662,8643	0,0124	7	470	483	LPCVEDYLSAILNR			Carbamidomethyl (C)[3]	
	1681,8431	1681,8409	-0,0022	-1	243	257	LSQTFPNADFAEITK	78	100		
	1681,8431	1681,8409	-0,0022	-1	243	257	LSQTFPNADFAEITK				
	1866,7708	1866,7991	0,0283	15	570	584	TVMDDFAQLDTCCK			Carbamidomethyl (C)[13,14], Oxidation (M)[3]	
	1882,9368	1882,9407	0,0039	2	509	524	RPCFSALTVDETVVPK			Carbamidomethyl (C)[3]	
	1917,8912	1917,8995	0,0083	4	153	168	ENPTTFMGHYLHEVAR			Oxidation (M)[7]	
	1955,0531	1955,0513	-0,0018	-1	89	105	SLHTLFGDKLCAIPNLR			Carbamidomethyl (C)[11]	
	1960,0498	1960,0521	0,0023	1	435	452	YTQKAPQVSTPTLVEAAR				
	1960,0498	1960,0521	0,0023	1	435	452	YTQKAPQVSTPTLVEAAR	62	100		
1981,9283	1981,9369	0,0086	4	585	602	AADKDTCFSTEGPNLVTR			Carbamidomethyl (C)[7]		
2286,1077	2286,1438	0,0361	16	342	360	NYAEAKDVFGLTFLEYYSR					
2503,2285	2503,2446	0,0161	6	414	434	TNCDLYEKLGEYGFQNAILVR			Carbamidomethyl (C)[3]		
Antitrombina-III	P32261	206	100	14	109	100	52483,8	6,1			
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification	

1179.5388	1179.6012	0.0624	53	2	14	YSPGAGSGAAGER			
1189.6323	1189,5834	-0,0489	-41	81	90	VWELSKANSR			
1198.7418	1198.7437	0.0019	2	437	446	ANRPFLVLIR			
1307.6338	1307.6823	0.0485	37	2	15	YSPGAGSGAAGERK			
1340.6633	1340.6676	0.0043	3	148	158	TSDQIHFFFAK			
1359.709	1359.717	0.008	6	47	57	DIPVNPCLCIYR	63	100	Carbamidomethyl (C)[8]
1359.709	1359.717	0.008	6	47	57	DIPVNPCLCIYR			Carbamidomethyl (C)[8]
1379.7351	1379,7307	-0,0044	-3	447	458	EVAlNTIIFMGR			Oxidation (M)[10]
1541.7383	1541.7383	0	0	91	103	FATNFYQHLADSK			
1700.8602	1700.8661	0.0059	3	203	216	LQPLDFKENPEQSR			
1700.8602	1700.8661	0.0059	3	203	216	LQPLDFKENPEQSR	46	99.991	
1730.8669	1730,8658	-0,0011	-1	134	147	QLMEVFKFDTISEK			Oxidation (M)[3]
1866.9452	1866,7991	-0,1461	-78	125	140	LGACNDTLKQLMEVFK			Carbamidomethyl (C)[4]
1866,9452	1866,7991	-0,1461	-78	125	140	LGACNDTLKQLMEVFK			Carbamidomethyl (C)[4], Oxidation (M)[12]
2299.1274	2299.1777	0.0503	22	104	124	NDNDNIFLSPISISTAFAMTK			
2315.1223	2315.1404	0.0181	8	104	124	NDNDNIFLSPISISTAFAMTK			Oxidation (M)[19]
2337.1567	2337.1641	0.0074	3	404	426	AFLEVNEEGEAAASTSVITGR			
2345.1885	2345.1895	0.001	0	382	403	SQLPVAGGRDDLVSADFHK			
184	Albúmina Sérica	P07724	574	100	20	422	100	70700,5	5,75
Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
1019.5784	1019.5809	0.0025	2	234	242	AFKAWAVAR			
1149.615	1149,6111	-0,0039	-3	66	75	LVQEVTDFAK			
1250.5801	1250.5919	0.0118	9	35	44	YNDLGEQHFK			
1439.7853	1439.786	0.0007	0	439	452	APQVSTPTLVEAAR			
1455.8066	1455.8092	0.0026	2	361	372	RHPDYSVLLLLR	46	99.991	
1455.8066	1455.8092	0.0026	2	361	372	RHPDYSVLLLLR			
1479.7954	1479.8099	0.0145	10	422	434	LGEYGFQNAILVR	51	99.998	
1479.7954	1479.8099	0.0145	10	422	434	LGEYGFQNAILVR			
1609.7897	1609.8004	0.0107	7	348	360	DVFLGTFLEYYSR	79	100	
1609.7897	1609.8004	0.0107	7	348	360	DVFLGTFLEYYSR			
1662.8519	1662.8563	0.0044	3	470	483	LPCVEDYLSAILNR			Carbamidomethyl (C)[3]
1681.8431	1681,8346	-0,0085	-5	243	257	LSQTFPNADFAEITK	84	100	
1681.8431	1681,8346	-0,0085	-5	243	257	LSQTFPNADFAEITK			
1714.7966	1714.8365	0.0399	23	118	130	QEPERNECFQHK			Carbamidomethyl (C)[8]
1866.7708	1866.7648	-0.006	-3	570	584	TMVDDFAQFLDTCCK			Carbamidomethyl (C)[13,14], Oxidation (M)[3]
1882.9368	1882.9388	0.002	1	509	524	RPCFSALTVDETYVPK			Carbamidomethyl (C)[3]
1917.8912	1917,885	-0,0062	-3	153	168	ENPTTFMGHYLHEVAR			Oxidation (M)[7]
1955.0531	1955.0535	0.0004	0	89	105	SLHTLFGDKLCAIPNLR			Carbamidomethyl (C)[11]
1960.0498	1960.0586	0.0088	4	435	452	YTQKAPQVSTPTLVEAAR	51	99.998	
1960.0498	1960.0586	0.0088	4	435	452	YTQKAPQVSTPTLVEAAR			
1981.9283	1981.9354	0.0071	4	585	602	AADKDTCFSTEGPNLVTR	114	100	Carbamidomethyl (C)[7]
1981.9283	1981.9354	0.0071	4	585	602	AADKDTCFSTEGPNLVTR			Carbamidomethyl (C)[7]
2153.022	2153.0742	0.0522	24	528	545	AETFTFHSDICTLPEKEK			Carbamidomethyl (C)[11]
2286.1077	2286.144	0.0363	16	342	360	NYAEAKDVFLGTFLEYYSR			
2287.1428	2287.1538	0.011	5	509	527	RPCFSALTVDETYVPKEFK			Carbamidomethyl (C)[3]
2503.2285	2503.2678	0.0393	16	414	434	TNCDLYEKLGEYGFQNAILVR			Carbamidomethyl (C)[3]
208	Complemento C3	P01027	507	100	24	394	100	187904,3	6,39
Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
1036.6011	1036,5272	-0,0739	-71	740	748	RDHVLGLAR			
1111.6218	1111,6083	-0,0135	-12	75	85	TVLTGASGHLR			
1197.615	1197,6021	-0,0129	-11	217	226	QIFSAEFEVK			
1238.6415	1238,6356	-0,0059	-5	227	236	EYVLPSFEVR	57	99.999	
1238.6415	1238,6356	-0,0059	-5	227	236	EYVLPSFEVR			
1370.7314	1370,7253	-0,0061	-4	138	149	TIYTPGSTVLYR			
1429.8049	1429,7842	-0,0207	-14	150	162	IFTVDNLLPVGK			
1442.7849	1442,7747	-0,0102	-7	292	305	VVIEDGVGDAVLR			
1450.7397	1450.7367	-0.003	-2	571	583	DNHLAPGQQTLLR			

	1479.7665	1479,7557	-0,0108	-7	487	497	IRYYTYLVMNK				Oxidation (M)[9]
	1511.8217	1511,8154	-0,0063	-4	531	544	LVAYYTLIGASGQR	86	100		
	1511.8217	1511,8154	-0,0063	-4	531	544	LVAYYTLIGASGQR				
	1519.725	1519,7148	-0,0102	-7	633	646	NYAGVFM DAGLAFK				Oxidation (M)[7]
	1532.8219	1532.8397	0.0178	12	914	927	AAVFNHFISDGVKK				
	1532.8219	1532.8397	0.0178	12	914	927	AAVFNHFISDGVKK				
	1638.8485	1638.8568	0.0083	5	849	861	AVLFNRYEEELK				
	1750.0472	1750,0393	-0,0079	-5	163	178	TVVILIEPDPGIPVKR				
	1750.0472	1750,0393	-0,0079	-5	163	178	TVVILIEPDPGIPVKR	61	100		
	1771.937	1771,9272	-0,0098	-6	307	323	VLMEGVRPSNADALV GK				Oxidation (M)[3]
	1787.969	1787,9525	-0,0165	-9	345	360	SGIPIVTSPIYQHFTK	87	100		
	1787.969	1787,9525	-0,0165	-9	345	360	SGIPIVTSPIYQHFTK				
	1875.942	1875,9326	-0,0094	-5	567	583	GDPDRNHLAPGQQTTLR				
	1909.9653	1909,9602	-0,0051	-3	265	282	NVDGTAFVIFGVQDGD KK	104	100		
	1909.9653	1909,9602	-0,0051	-3	265	282	NVDGTAFVIFGVQDGD KK				
	1912.9697	1912.9667	-0.003	-2	463	478	MELKPGDNLNINVFHLR				Oxidation (M)[1]
	2417.2388	2417.2524	0.0136	6	217	236	QIFSAEFEVKEYVLP SF E VR				
	2454.3279	2454.3308	0.0029	1	509	530	EPGQDLVVLSPITPEFIP SFR				
	2643.2986	2643.3489	0.0503	19	364	387	FFKPAMPFDLMV FVTNPDGSPASK				
	2675.2883	2675.3069	0.0186	7	364	387	FFKPAMPFDLMV FVTNPDGSPASK				Oxidation (M)[6,11]
	2705.2195	2705,1736	-0,0459	-17	440	462	TMEAHPYSTMHNSN NYLHLSVSR				Oxidation (M)[2]
	2721.2144	2721.2205	0.0061	2	440	462	TMEAHPYSTMHNSN NYLHLSVSR				Oxidation (M)[2,10]
	3352.7271	3352,7085	-0,0186	-6	38	67	LESEETIVLEAHD AQGDIPVTVVQDFLKR				
225	Ig alpha chain C region	P01878	219	100	7	175	100	37593,5	4,97		
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification	
	896.426	896.4288	0.0028	3	187	194	WNSGASFK	46	99.992		
	896.426	896.4288	0.0028	3	187	194	WNSGASFK				
	1619.77	1619.7723	0.0023	1	145	159	NPEGAVFTWEPSTGK				
	2161.0559	2161.0549	-0.001	0	145	164	NPEGAVFTWEPSTGKDAVQK				
	2301.0056	2301.0156	0.01	4	166	186	AVQNSCGCYSVSSVLP GCAER	119	100	Carbamidomethyl (C)[6,8,18]	
	2301.0056	2301.0156	0.01	4	166	186	AVQNSCGCYSVSSVLP GCAER			Carbamidomethyl (C)[6,8,18]	
	2329.105	2329.1345	0.0295	13	323	344	LSGKPTNVSVSVMSEG D GICY			Carbamidomethyl (C)[21], Oxidation (M)[14]	
	2429.1006	2429.1145	0.0139	6	165	186	KAVQNSCGCYSVSSVLP GCAER			Carbamidomethyl (C)[7,9,19]	
	2473.0581	2473,0552	-0,0029	-1	298	318	QGDQYSCMVGHEALPMNFTQK	10	68,687	Carbamidomethyl (C)[7], Oxidation (M)[8,16]	
	2473.0581	2473,0552	-0,0029	-1	298	318	QGDQYSCMVGHEALPMNFTQK			Carbamidomethyl (C)[7], Oxidation (M)[8,16]	
233	Ig gamma-2B chain C region	P01867	100	100	2	94	100	44972,5	6,1		
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification	
	1778.98	1778,9799	-0,0001	0	233	248	APQVYVLP PPAEQLSR	94	100		
	1778.98	1778,9799	-0,0001	0	233	248	APQVYVLP PPAEQLSR				
	1877.8804	1877,8651	-0,0153	-8	281	297	DTAPVLDS DGSYFYISK				
	Ig gamma-2A chain C region secreted form	P01864	53	99,569	4	35	99,916	37085,8	8,52		
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification	
	1785.9092	1785,9003	-0,0089	-5	233	248	APQVYVLP PPAEEMTK			Oxidation (M)[14]	
	1811.9109	1811,9064	-0,0045	-2	190	205	VVSALPIQH QDWMMSGK			Oxidation (M)[13]	
	1898.8477	1898.9481	0.1004	53	281	297	NTATVLDS DGSYFYMYSK				
	1914.004	1914.001	-0.003	-2	233	249	APQVYVLP PPAEEMTKK			Oxidation (M)[14]	
	1914.8425	1914,8384	-0,0041	-2	281	297	NTATVLDS DGSYFYMYSK			Oxidation (M)[14]	
	1914.8425	1914,8384	-0,0041	-2	281	297	NTATVLDS DGSYFYMYSK	35	100	Oxidation (M)[14]	
239	Ig mu chain C region secreted form	P01872	59	99,904	5	41	99,98	50624,5	6,56		
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification	
	903.4318	903,4304	-0,0014	-2	121	129	DGFSGPAPR				
	1330.7631	1330,7622	-0,0009	-1	328	339	HPPAVYLLPPAR				
	1603.8228	1603.8318	0.009	6	356	369	GFSPADISVQWLQR	41	99.98		
	1603.8228	1603.8318	0.009	6	356	369	GFSPADISVQWLQR				
	1749.8905	1749,9166	0,0261	15	155	170	LVESGF TDPVTIENK				
	2510.2959	2510,2866	-0,0093	-4	179	199	VISTLTISEIDWLN LN VYTCR			Carbamidomethyl (C)[20]	
	Ig mu chain C region membrane bound form	P01873	58	99,884	5	41	99,98	53120,9	5,98		

	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	903.4318	903.4304	-0,0014	-2	121	129	DGFSGPAPR			
	1330.7631	1330.7622	-0,0009	-1	328	339	HPPAVYLLPPAR			
	1603.8228	1603.8318	0.009	6	356	369	GFSPADISVQWLQR	41	99.98	
	1603.8228	1603.8318	0.009	6	356	369	GFSPADISVQWLQR			
	1749.8905	1749.9166	0.0261	15	155	170	LVESGFTDPVTIENK			
	2510.2959	2510,2866	-0,0093	-4	179	199	VISTLTISEIDWLNLNVTCT			Carbamidomethyl (C)[20]
253	Factor Coagulation V	O88783	283	100	10	272	100	248216,6	5,68	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	1134.5466	1134,5305	-0,0161	-14	67	74	EYEQYFKK			
	1537.7686	1537,767	-0,0016	-1	63	73	IVYREYEQYFK			
	1553.7417	1553,7302	-0,0115	-7	314	326	HYQAGMQAYIDIK	62	100	Oxidation (M)[6]
	1553.7417	1553,7302	-0,0115	-7	314	326	HYQAGMQAYIDIK			Oxidation (M)[6]
	1645.9384	1645,9299	-0,0085	-5	103	117	NKADKPLSIHPQGIK			
	1657.8632	1657.7922	-0.071	-43	2145	2158	GHMKNFFNPPIISR			
	1716.7979	1716.8536	0.0557	32	1714	1727	GTLHMERNLPMMDMR			Oxidation (M)[5]
	1784.7875	1784,783	-0,0045	-3	121	136	FSEGASYADHTFPAER	111	100	
	1784.7875	1784,783	-0,0045	-3	121	136	FSEGASYADHTFPAER			
	2020.0597	2020,0515	-0,0082	-4	79	98	SSNSGLLGPTLYAEVGDVIK			
	2020.0597	2020,0515	-0,0082	-4	79	98	SSNSGLLGPTLYAEVGDVIK	100	100	
	2070.0364	2070,0305	-0,0059	-3	205	221	MFDKQHVLLEAFVDFESK			Oxidation (M)[1]
	2559.3564	2559.3684	0.012	5	79	102	SSNSGLLGPTLYAEVGDVIKVFHR			
258	ApoAIV	P06728	774	100	26	511	100	45001,1	5,41	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	978.489	978.49	0.001	1	44	51	EAVEQFQK			
	1131.6521	1131.6592	0.0071	6	155	163	LQLTPYIQR			
	1131.6521	1131.6592	0.0071	6	155	163	LQLTPYIQR	50	100	
	1231.6793	1231.6964	0.0171	14	317	326	ALVQLEQFR	78	100	
	1231.6793	1231.6964	0.0171	14	317	326	ALVQLEQFR			
	1241.71	1241.7131	0.0031	2	222	233	SLAPLTVGVQEK			
	1287.6539	1287.6642	0.0103	8	210	220	ATIDQNLEDLR			
	1298.6045	1298,6007	-0,0038	-3	120	130	VTQTFGENMQK			Oxidation (M)[9]
	1305.6433	1305.6527	0.0094	7	295	304	QLEQQVEEFR	68	100	
	1305.6433	1305.6527	0.0094	7	295	304	QLEQQVEEFR			
	1312.7107	1312.7112	0.0005	0	266	277	NLAPLVEDVQSK			
	1314.5704	1314.5736	0.0032	2	306	316	TVPEPMGEMFNK			Oxidation (M)[5,8]
	1440.7263	1440.7283	0.002	1	193	204	NMEELKGHLTPR			Oxidation (M)[2]
	1443.755	1443.7605	0.0055	4	210	221	ATIDQNLEDLRR			
	1461.7445	1461.7532	0.0087	6	295	305	QLEQQVEEFR	57	99.999	
	1461.7445	1461.7532	0.0087	6	295	305	QLEQQVEEFR			
	1578.7402	1578.7454	0.0052	3	234	246	LNHQMEGLAFQMK			Oxidation (M)[5,12]
	1623.8225	1623.8303	0.0078	5	52	65	TDVTQQLSTLFQDK			
	1706.8352	1706.8414	0.0062	4	234	247	LNHQMEGLAFQMKK			Oxidation (M)[5,12]
	2023.1334	2023,1156	-0,0178	-9	80	97	LVPFVQLSGHLAKETER	125	100	
	2023.1334	2023,1156	-0,0178	-9	80	97	LVPFVQLSGHLAKETER			
	2099.0403	2099.0554	0.0151	7	327	345	QQLGPNSEGEVSHLSFLEK	134	100	
	2099.0403	2099.0554	0.0151	7	327	345	QQLGPNSEGEVSHLSFLEK			
	2133.0571	2133.0974	0.0403	19	288	304	SLEDLNRQLEQQVEEFR			
	2139.9619	2139.9961	0.0342	16	113	130	MMPHANKVTQTFGENMQK			Oxidation (M)[1,2,16]
	2271.1108	2271.2124	0.1016	45	170	189	ENVDNLHTSMPLATNLKDK			
	2583.2937	2583.3191	0.0254	10	44	65	EAVEQFQKTDVTQQLSTLFQDK			
	2870.4353	2870.4761	0.0408	14	131	154	LQEHLKPYAVDLQDQINTQTQEMK			
	2886.4302	2886.4663	0.0361	13	131	154	LQEHLKPYAVDLQDQINTQTQEMK			Oxidation (M)[23]
	3052.4858	3052.5198	0.034	11	52	79	TDVTQQLSTLFQDKLGDASTYADGVHNNK			
	3311.7019	3311.7056	0.0037	1	317	345	ALVQLEQFRQLGPNSEGEVSHLSFLEK			
	3723.8096	3723.8613	0.0517	14	362	395	GSPDQPQALPLPEQAQEAQEAQEQVQPKPLES			
	3851.9045	3851.9688	0.0643	17	361	395	KGSPDQPQALPLPEQAQEAQEAQEQVQPKPLES			

288	Proteína fosfatasa 1G	Q61074	50	99,079	5	33	99,917	59375,7	4,27	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	1121.5367	1121.5933	0.0566	50	376	386	NAGGKVTMDGR	33	99,817	Oxidation (M)[8]
	1121.5367	1121.5933	0.0566	50	376	386	NAGGKVTMDGR			Oxidation (M)[8]
	1638.8097	1638.8246	0.0149	9	23	36	LPLPYGFSAMQGWR			Oxidation (M)[10]
	1793.9467	1793,9348	-0,0119	-7	407	422	NLPPQEQMISALPDIK			
	1865.8247	1865.9023	0.0776	42	519	536	LEEALSTEGAEDTGNSDK			
	1993.9196	1994.0312	0.1116	56	519	537	LEEALSTEGAEDTGNSDK			
305	ApoE	P08226	151	100	4	133	100	35901,4	5,56	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	1599.786	1599.9231	0.1371	86	87	100	ELEEQLGPVAEETR	126	100	
	1599.786	1599.9231	0.1371	86	87	100	ELEEQLGPVAEETR			
	1772.8788	1772.9768	0.098	55	271	284	LKGWFEPIVEDMHR			Oxidation (M)[12]
	1994.0553	1994,0376	-0,0177	-9	293	311	IQASVATNPIITPVAQENQ			
	1994.0553	1994,0376	-0,0177	-9	293	311	IQASVATNPIITPVAQENQ	7	65	
	2377.1565	2377.1465	-0.01	-4	125	144	LGQYRNEVHTMLGQSTEEIR			Oxidation (M)[11]
309	Complemento C4-B	P01029	467	100	20	415	100	194417,2	7,38	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	837.4286	837,4049	-0,0237	-28	1719	1725	AACFQLK			Carbamidomethyl (C)[3]
	942.493	942.4991	0.0061	6	1617	1624	VEYGFTVK	49	99,996	
	942.493	942.4991	0.0061	6	1617	1624	VEYGFTVK			
	975.4741	975,436	-0,0381	-39	1452	1459	VVEEQESR			
	976.4345	976.4503	0.0158	16	1610	1616	FACYYPR	50	99,997	Carbamidomethyl (C)[3]
	976.4345	976.4503	0.0158	16	1610	1616	FACYYPR			Carbamidomethyl (C)[3]
	1013.5891	1013.5975	0.0084	8	1641	1648	ITQVLHFR	63	100	
	1013.5891	1013.5975	0.0084	8	1641	1648	ITQVLHFR			
	1131.5139	1131.5239	0.01	9	1726	1734	DFLMEFSSR			
	1141.6841	1141.6801	-0.004	-4	1641	1649	ITQVLHFR			
	1143.5503	1143.556	0.0057	5	1560	1569	CSVFYAAPT			Carbamidomethyl (C)[1]
	1147.5088	1147.5197	0.0109	9	1726	1734	DFLMEFSSR			Oxidation (M)[4]
	1147.5088	1147.5197	0.0109	9	1726	1734	DFLMEFSSR	26	99,216	Oxidation (M)[4]
	1198.615	1198,6145	-0,0005	0	1048	1056	GYMRIQQFR			
	1223.6049	1223.6191	0.0142	12	1649	1659	KDTMASIGQTR			Oxidation (M)[4]
	1224.6194	1224.6392	0.0198	16	1460	1468	VQYTVCIWR	47	99,993	Carbamidomethyl (C)[6]
	1224.6194	1224.6392	0.0198	16	1460	1468	VQYTVCIWR			Carbamidomethyl (C)[6]
	1256.7256	1256,6305	-0,0951	-76	816	826	GLCVAKPTRVR			Carbamidomethyl (C)[3]
	1256.7256	1256,6305	-0,0951	-76	816	826	GLCVAKPTRVR			Carbamidomethyl (C)[3]
	1347.7114	1347.7174	0.006	4	1493	1504	ADLEKLTSLSDR			
	1400.7015	1400.7059	0.0044	3	1448	1459	EAPKVVEEQESR			
	1500.6313	1500.7372	0.1059	71	700	711	CCQDGMTKLPKM			Carbamidomethyl (C)[1,2], Oxidation(M)[6,11]
	1557.8271	1557,7286	-0,0985	-63	360	373	FVSSAFSLDLRSTK			
	1965.9197	1965.927	0.0073	4	1719	1734	AACFQLKDFLMEFSSR			Carbamidomethyl (C)[3], Oxidation (M)[11]
	2096.9409	2096.9583	0.0174	8	1570	1588	SQLLATLCSGDVQCQAEKG	99	100	Carbamidomethyl (C)[8,13,15]
	2096.9409	2096.9583	0.0174	8	1570	1588	SQLLATLCSGDVQCQAEKG			Carbamidomethyl (C)[8,13,15]
	2172.1846	2172.1863	0.0017	1	1472	1492	LGLSGMAIADITLISGFHALR			Oxidation (M)[6]
	2680.3042	2680.3013	-0.0029	-1	1505	1527	YVSHFETDGPVHLLYFDSVPTTR	80	100	
	2680.3042	2680.3013	-0.0029	-1	1505	1527	YVSHFETDGPVHLLYFDSVPTTR			
324	Clusterina	Q06890	451	100	10	390	100	52249,8	5,46	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	1057.5941	1057,592	-0,0021	-2	214	221	RPHFLYPK	56	99,999	
	1057.5941	1057,592	-0,0021	-2	214	221	RPHFLYPK			
	1231.6892	1231,6813	-0,0079	-6	68	78	SLLNSLEEAKK			
	1335.6903	1335,6892	-0,0011	-1	182	193	ASGIIDTLFQDR			
	1335.6903	1335,6892	-0,0011	-1	182	193	ASGIIDTLFQDR	69	100	
	1603.8802	1603,876	-0,0042	-3	40	53	YINKEIQNAVQGVK			
	1603.8802	1603,876	-0,0042	-3	40	53	YINKEIQNAVQGVK	93	100	
	1716.8262	1716.8569	0.0307	18	429	442	FMDTVAEKALQEYR			Oxidation (M)[2]

	1739.8018	1739.8029	0.0011	1	167	181	QQSQVLDAMQDSFAR	60	100	Oxidation (M)[9]
	1739.8018	1739.8029	0.0011	1	167	181	QQSQVLDAMQDSFAR			Oxidation (M)[9]
	1856.9653	1856.97	0.0047	3	182	197	ASGIIDTLFQDRFFAR			
	1856.9653	1856.97	0.0047	3	182	197	ASGIIDTLFQDRFFAR	23	99	
	1920.9391	1920.9438	0.0047	2	198	213	ELHDPHYFSPIGFPHK	89	100	
	1920.9391	1920.9438	0.0047	2	198	213	ELHDPHYFSPIGFPHK			
	2768.3157	2768.3391	0.0234	8	158	181	IDSLLSDRQQSQVLDAMQDSFAR			Oxidation (M)[18]
	2959.5154	2959.5298	0.0144	5	198	221	ELHDPHYFSPIGFPHKRPFLYPK			
326	ApoE	P08226	650	100	23	435	100	35901,4	5,56	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	899.441	899.4567	0.0157	17	43	48	FWDYLR			
	899.441	899.4567	0.0157	17	43	48	FWDYLR	41	100	
	968.5522	968.5804	0.0282	29	191	199	LGPLVEQGR	71	100	
	968.5522	968.5804	0.0282	29	191	199	LGPLVEQGR			
	1015.5166	1015.5724	0.0558	55	228	236	LEEVGNQAR			
	1019.4978	1019.5133	0.0155	15	285	292	QWANLMEK			
	1033.5537	1033.5839	0.0302	29	217	225	AQAFGDRIR			
	1035.4966	1035.5402	0.0436	42	215	223	DRAQAFGDR			
	1075.5895	1075.6375	0.048	45	262	270	LQAEIFQAR	71	100	
	1075.5895	1075.6375	0.048	45	262	270	LQAEIFQAR			
	1162.5521	1162.5989	0.0468	40	253	261	MEEQTQQIR			
	1170.6589	1170.7072	0.0483	41	103	113	LGKEVQAAQAR			
	1228.6393	1228.6971	0.0578	47	226	236	GRLEEVGNQAR			
	1239.6804	1239.7421	0.0617	50	202	214	TANLGAGAAQPLR			
	1289.6267	1289.6915	0.0648	50	114	124	LGADMEDLRNR			
	1305.6216	1305.6827	0.0611	47	114	124	LGADMEDLRNR			Oxidation (M)[5]
	1377.6791	1377.7582	0.0791	57	251	261	SKMEEQTQQIR			
	1393.674	1393.7524	0.0784	56	251	261	SKMEEQTQQIR			Oxidation (M)[3]
	1510.8085	1510.9045	0.096	64	202	216	TANLGAGAAQPLRDR			
	1510.8085	1510.9045	0.096	64	202	216	TANLGAGAAQPLRDR	45	99,991	
	1515.705	1515.8055	0.1005	66	273	284	GWFEPIVDMHR			
	1531.6998	1531.7986	0.0988	65	273	284	GWFEPIVDMHR			Oxidation (M)[10]
	1599.786	1599.8979	0.1119	70	87	100	ELEEQLGPVAEETR			
	1599.786	1599.8979	0.1119	70	87	100	ELEEQLGPVAEETR	130	100	
	1727.881	1728.0096	0.1286	74	86	100	KELEEQLGPVAEETR			
	1743.833	1743.9758	0.1428	82	130	144	NEVHTMLGQSTEEIR			
	1756.8839	1757.024	0.1401	80	271	284	LKGWFPEIVDMHR	77	100	
	1756.8839	1757.024	0.1401	80	271	284	LKGWFPEIVDMHR			
	1759.8279	1759.9869	0.159	90	130	144	NEVHTMLGQSTEEIR			Oxidation (M)[6]
	1772.8788	1773.0106	0.1318	74	271	284	LKGWFPEIVDMHR	24	99,014	Oxidation (M)[12]
	1772.8788	1773.0106	0.1318	74	271	284	LKGWFPEIVDMHR			Oxidation (M)[12]
	1826.9242	1827.032	0.1078	59	87	102	ELEEQLGPVAEETRAR			
	1986.9662	1987.1323	0.1661	84	130	146	NEVHTMLGQSTEEIRAR			Oxidation (M)[6]
	1994.0553	1994.1864	0.1311	66	293	311	IQASVATNPIITPVAQENQ			
	2361.1616	2361.3931	0.2315	98	125	144	LGQYRNEVHTMLGQSTEEIR			
	2377.1565	2377.3899	0.2334	98	125	144	LGQYRNEVHTMLGQSTEEIR			Oxidation (M)[11]
346	Ig lambda 1 chainC region	P01843	81	99,999	5	34	99,869	11738,6	5,87	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	1392.6827	1392,6813	-0,0014	-1	65	76	YMASSYLTLTAR			Oxidation (M)[2]
	1791.8429	1791,8124	-0,0305	-17	43	59	VDGTPVTQGMETTQPSK			Oxidation (M)[10]
	1791.8429	1791,8124	-0,0305	-17	43	59	VDGTPVTQGMETTQPSK			Oxidation (M)[10]
	1963.9542	1963,952	-0,0022	-1	60	76	QSNNKYMAYSSYLTLTAR	7	43,131	Oxidation (M)[7]
	1963.9542	1963,952	-0,0022	-1	60	76	QSNNKYMAYSSYLTLTAR			Oxidation (M)[7]
	1985.8771	1985.8806	0.0035	2	81	97	HSSYSCQVTHEGHTVEK			Carbamidomethyl (C)[6]
	2049.0022	2049,0007	-0,0015	-1	4	22	SSPSVTLFPPSSEELETNK	26	99	
348	Proteasoma subunidad alpha tipo-6	Q9QUM9	214	100	10	146	100	27811	6,34	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification

	1108.5535	1108.5626	0.0091	8	94	102	ARYEAAANWK			
	1156.611	1156.6144	0.0034	3	12	21	HITIFSPGR			
	1156.611	1156.6144	0.0034	3	12	21	HITIFSPGR	52	99.998	
	1160.5986	1160.589	-0.0096	-8	22	30	LYQVEYAFK			
	1285.7223	1285.7222	-0.0001	0	31	43	AINQGGLTSVAVR			
	1285.7223	1285.7222	-0.0001	0	31	43	AINQGGLTSVAVR	94	100	
	1337.5289	1337.537	0.0081	6	154	164	CDPAGYYCGFK			Carbamidomethyl (C)[1,8]
	1360.7471	1360.7296	-0.0175	-13	60	71	LLDSSTVTHLFK			
	1503.6858	1503.6927	0.0069	5	105	116	YGYEIPVDMLCK			Carbamidomethyl (C)[11], Oxidation (M)[9]
	1794.8441	1794.8127	-0.0314	-17	103	116	YKYGEIPVDMLCK			Carbamidomethyl (C)[13], Oxidation (M)[11]
	1860.8136	1860.8013	-0.0123	-7	72	88	ITESIGCVMTGMTADSR			Carbamidomethyl (C)[7], Oxidation (M)[9,12]
	1979.0443	1979.0455	0.0012	1	229	246	ILTEAEIDAHLVALAERD			
	Apo AI	Q00623	527	100	20	342	100	30568,7	5,64	
361	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	1040.5847	1040.5884	0.0037	4	228	236	ARPALEDLR			
	1040.5847	1040.5884	0.0037	4	228	236	ARPALEDLR	39	99.957	
	1047.5469	1047.5551	0.0082	8	164	172	LSPVAEEFR	37	99.92	
	1047.5469	1047.5551	0.0082	8	164	172	LSPVAEEFR			
	1066.484	1066.4886	0.0046	4	93	100	DFWDNLEK			
	1099.6218	1099.6265	0.0047	4	155	163	QKQLQELQGR			
	1130.5735	1130,5701	-0,0034	-3	175	183	MRTHVDSLK			Oxidation (M)[1]
	1179.6005	1179.6028	0.0023	2	133	141	EDVELYRQK			
	1237.6212	1237.6257	0.0045	4	131	139	WKEDVELYR			
	1237.6212	1237.6257	0.0045	4	131	139	WKEDVELYR	67	100	
	1240.6208	1240.6234	0.0026	2	36	46	DFANVYVDAVK			
	1266.6365	1266,6322	-0,0043	-3	120	129	VQPYLDEFQK			
	1313.6267	1313.6281	0.0014	1	184	194	TQLAPHSEQMR			Oxidation (M)[10]
	1318.6749	1318.6792	0.0043	3	164	174	LSPVAEEFRDR	41	99.968	
	1318.6749	1318.6792	0.0043	3	164	174	LSPVAEEFRDR			
	1331.6339	1331.6426	0.0087	7	206	216	SNPTLNEYHTR			
	1331.6339	1331.6426	0.0087	7	206	216	SNPTLNEYHTR	31	100	
	1340.7168	1340.7197	0.0029	2	142	154	VAPLGAELQESAR	54	99.998	
	1340.7168	1340.7197	0.0029	2	142	154	VAPLGAELQESAR			
	1394.7314	1394,7281	-0,0033	-2	120	130	VQPYLDEFQKK	66	100	
	1394.7314	1394,7281	-0,0033	-2	120	130	VQPYLDEFQKK			
	1467.7842	1467,7819	-0,0023	-2	34	46	VKDFANVYVDAVK			
	1596.8704	1596.8722	0.0018	1	142	156	VAPLGAELQESARQK			
	1655.8024	1655.8104	0.008	5	36	50	DFANVYVDAVKDSGR			
	1852.8501	1852.8939	0.0438	24	93	106	DFWDNLEKETDWWVR			
	1885.9767	1885.9293	-0.0474	-25	201	216	LAELKSNPTLNEYHTR			
	1997.9822	1997.9891	0.0069	3	184	200	TQLAPHSEQMRESLAQR	10	60,019	Oxidation (M)[10]
	1997.9822	1997.9891	0.0069	3	184	200	TQLAPHSEQMRESLAQR			Oxidation (M)[10]
362	Ig kappa chain C region	P01837	92	100	4	56	99,999	30568,7	5,64	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	926,3784	926,3635	-0,0149	-16	100	106	SFNRNEC			Carbamidomethyl (C)[7]
	990.5002	990.5104	0.0102	10	40	47	WKIDGSER	19	95.948	
	990.5002	990.5104	0.0102	10	40	47	WKIDGSER			
	2243.002	2243.0034	0.0014	1	62	80	DSTYSMSSTLTLTKDEYER			Oxidation (M)[6]
	2243.002	2243.0034	0.0014	1	62	80	DSTYSMSSTLTLTKDEYER	37	99,935	Oxidation (M)[6]
	3571.7412	3571,7334	-0,0078	-2	1	34	ADAAPTIVSIFPPSSSQLTSGGASVVCFLNFFPK			Carbamidomethyl (C)[26]
364	Apo AI	Q00623	406	100	16	277	100	30568,7	5,64	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	1040.5847	1040.5973	0.0126	12	228	236	ARPALEDLR			
	1040.5847	1040.5973	0.0126	12	228	236	ARPALEDLR	33	99.833	
	1047.5469	1047.5632	0.0163	16	164	172	LSPVAEEFR			
	1066.484	1066.5029	0.0189	18	93	100	DFWDNLEK			
	1099.6218	1099.6318	0.01	9	155	163	QKQLQELQGR			



1179.6005	1179.6121	0.0116	10	133	141	EDVELYRQK			
1237.6212	1237.6252	0.004	3	131	139	WKEDVELYR			
1237.6212	1237.6252	0.004	3	131	139	WKEDVELYR	62	100	
1240.6208	1240.6287	0.0079	6	36	46	DFANVYVDAVK			
1266.6365	1266.639	0.0025	2	120	129	VQPYLDEFQK			
1318.6749	1318.6868	0.0119	9	164	174	LSPVAEEFRDR	51	99.997	
1318.6749	1318.6868	0.0119	9	164	174	LSPVAEEFRDR			
1331.6339	1331.6473	0.0134	10	206	216	SNPTLNEYHTR	9	55.224	
1331.6339	1331.6473	0.0134	10	206	216	SNPTLNEYHTR			
1340.7168	1340.7289	0.0121	9	142	154	VAPLGAELQESAR			
1340.7168	1340.7289	0.0121	9	142	154	VAPLGAELQESAR	55	99.999	
1394.7314	1394.7327	0.0013	1	120	130	VQPYLDEFQKK	50	99.997	
1394.7314	1394.7327	0.0013	1	120	130	VQPYLDEFQKK			
1467.7842	1467,7778	-0,0064	-4	34	46	VKDFANVYVDAVK			
1596.8704	1596.8796	0.0092	6	142	156	VAPLGAELQESARQK			
1885.9767	1885.9932	0.0165	9	201	216	LAELKSNPTLNEYHTR			
1997.9822	1997.9812	-0.001	-1	184	200	TQLAPHSEQMRESLAQR	18	93,805	Oxidation (M)[10]
1997.9822	1997.9812	-0.001	-1	184	200	TQLAPHSEQMRESLAQR			Oxidation (M)[10]
Glutati3n peroxidasa 3		P46412	94	100	8	32	99,725	25579,9	8,33

Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
818.4446	818,4372	-0,0074	-9	148	153	FYTLK			
1300.7083	1300.7262	0.0179	14	186	197	FLVGPDGIPVVMR			
1316.7031	1316.7046	0.0015	1	186	197	FLVGPDGIPVVMR			Oxidation (M)[11]
1540.7853	1540.788	0.0027	2	107	120	QEPGENSEILPSLK			
1555.7533	1555.7784	0.0251	16	154	168	NSCPPTAELLGSPGR			Carbamidomethyl (C)[3]
1600.8304	1600.864	0.0336	21	169	180	LFWEPMKIHDIR			Oxidation (M)[6]
1789.8823	1789.8856	0.0033	2	202	216	TTVSNVKMDILSYMR			Oxidation (M)[8,14]
1955.0173	1955.04	0.0227	12	121	137	YVRPGGGFVFNQFLFEK	32	99.795	
1955.0173	1955.04	0.0227	12	121	137	YVRPGGGFVFNQFLFEK			
2654.3359	2654.397	0.0611	23	121	144	YVRPGGGFVFNQFLFEKGDVNGEK			
365 Complemento C4-B		P01029	59	99,901	11	44	99,988	19441,2	7,38

Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
822.4733	822.4836	0.0103	13	831	836	FHLHLR			
950.5682	950.5726	0.0044	5	830	836	KFHLHLR			
1065.5211	1065.5265	0.0054	5	689	698	LGQYSSPDAK			
1107.568	1107,5676	-0,0004	0	915	925	GVFDLGDVAVSK			
1157.5078	1157.6008	0.093	80	578	586	EYRNADMMK			
1277.6089	1277.7062	0.0973	76	511	521	GQIMAMGREPR			Oxidation (M)[4,6]
1335.6481	1335.6633	0.0152	11	774	783	TSPENWLWR	44	99.988	
1335.6481	1335.6633	0.0152	11	774	783	TSPENWLWR			
1339.7692	1339,6611	-0,1081	-81	303	314	LVEGRTHISISK			
1367.7206	1367.6556	-0.065	-48	1069	1080	DSSTWLTAFVLK			
1367.7206	1367.6556	-0.065	-48	1069	1080	DSSTWLTAFVLK			
1716.9642	1716,9011	-0,0631	-37	595	612	ALVALGAVDTALYAVGGR			
2441.125	2441.1582	0.0332	14	754	773	NNHNMLQEEDLIDEDDILVR			Oxidation (M)[5]
368 Apo AI		Q00623	260	100	15	147	100	30568,7	5,64

Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
1040.5847	1040,5842	-0,0005	0	228	236	ARPAEDLR			
1047.5469	1047.551	0.0041	4	164	172	LSPVAEEFR			
1099.6218	1099.6234	0.0016	1	155	163	QKLQELQGR			
1179.6005	1179.604	0.0035	3	133	141	EDVELYRQK			
1237.6212	1237.6251	0.0039	3	131	139	WKEDVELYR	25	98.771	
1237.6212	1237.6251	0.0039	3	131	139	WKEDVELYR			
1266.6365	1266.6389	0.0024	2	120	129	VQPYLDEFQK			
1318.6749	1318,6741	-0,0008	-1	164	174	LSPVAEEFRDR			
1318.6749	1318,6741	-0,0008	-1	164	174	LSPVAEEFRDR	31	99.666	
1331.6339	1331.6482	0.0143	11	206	216	SNPTLNEYHTR			

1340.7168	1340.7148	-0.002	-1	142	154	VAPLGAELQESAR				
1340.7168	1340.7148	-0.002	-1	142	154	VAPLGAELQESAR	48	99.994		
1394.7314	1394.7275	-0.0039	-3	120	130	VQPYLDEFQKK				
1394.7314	1394.7275	-0.0039	-3	120	130	VQPYLDEFQKK	44	99.985		
1467.7842	1467.7688	-0.0154	-10	34	46	VKDFANVYVDAVK				
1528.8226	1528.8048	-0.0178	-12	237	249	HSLMPMLETLTK				
1528.8226	1528.8048	-0.0178	-12	237	249	HSLMPMLETLTK				
1544.8175	1544.8276	0.0101	7	237	249	HSLMPMLETLTK				Oxidation (M)[4]
1560.8124	1560.7979	-0.0145	-9	237	249	HSLMPMLETLTK				Oxidation (M)[4,6]
1596.8704	1596.8729	0.0025	2	142	156	VAPLGAELQESARQK				
1885.9767	1885.9736	-0.0031	-2	201	216	LAELKSNPTLNEYHTR				
1997.9822	1997.9749	-0.0073	-4	184	200	TQLAPHSEQMRESLAQR				Oxidation (M)[10]
lg kappa chain V-VI region NQ2-6.1		P04945	102	100	2	88	100	11819,7	8,98	
Calc. Mass.		Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
1717.9482		1717.9547	0.0065	4	45	60	LLYDTSNLAGVPPVR	88	100	
1717.9482		1717.9547	0.0065	4	45	60	LLYDTSNLAGVPPVR			
1886.0051		1885.9736	-0.0315	-17	1	18	QILLTQSPAIMSASPQK			Oxidation (M)[11]
lg kappa chain C region		P01837	83	100	3	60	100	11941,6	5,23	
Calc. Mass.		Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
990.5002		990.5024	0.0022	2	40	47	WKIDGSER	60	100	
990.5002		990.5024	0.0022	2	40	47	WKIDGSER			
1591.7347		1591.8253	0.0906	57	48	61	QNGVLNSWTDQDSK			
2243.002		2243.0071	0.0051	2	62	80	DSTYSMSSTLTLTKDEYER			Oxidation (M)[6]
lg kappa chain V-III region 50S10.1		P03977	66	99,979	3	43	99,98	12148,8	4,9	
Calc. Mass.		Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
1616.8755		1616.8749	-0.0006	0	50	65	LLIYAASNQSGVPPAR			
1638.8737		1638.8621	-0.0116	-7	97	111	EVPTFTGGGKLEIK			
1855.0283		1855.0266	-0.0017	-1	1	18	DIVLTQSPASLAVSLGQR	43	99.98	
1855.0283		1855.0266	-0.0017	-1	1	18	DIVLTQSPASLAVSLGQR			
lg kappa chain C region		P01837	299	100	6	236	100	11941,6	5,23	
Calc. Mass.		Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
990.5002		990.5026	0.0024	2	40	47	WKIDGSER	61	100	
990.5002		990.5026	0.0024	2	40	47	WKIDGSER			
1347.5747		1347.5707	-0.004	-3	81	91	HNSYTCEATHK			Carbamidomethyl (C)[6]
1347.5747		1347.5707	-0.004	-3	81	91	HNSYTCEATHK	83	100	Carbamidomethyl (C)[6]
1591.7347		1591.7527	0.018	11	48	61	QNGVLNSWTDQDSK			
2039.8512		2039.8506	-0.0006	0	76	91	DEYERHNSYTCEATHK			Carbamidomethyl (C)[11]
2227.0071		2227.0325	0.0254	11	62	80	DSTYSMSSTLTLTKDEYER			
2243.002		2243.0046	0.0026	1	62	80	DSTYSMSSTLTLTKDEYER			Oxidation (M)[6]
2243.002		2243.0046	0.0026	1	62	80	DSTYSMSSTLTLTKDEYER	92	100	Oxidation (M)[6]
3571.7412		3571.7581	0.0169	5	1	34	ADAAPTVISFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPK			Carbamidomethyl (C)[26]
lg kappa chain V-II region 26-10		P01631	240	100	3	217	100	12379,3	9,04	
Calc. Mass.		Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
1233.6334		1233.6266	-0.0068	-6	56	66	VSNRFGVPPDR			
1303.6165		1303.6172	0.0007	1	67	79	FGSGSGTDFTLK			
1303.6165		1303.6172	0.0007	1	67	79	FGSGSGTDFTLK	117	100	
2061.9875		2061.9937	0.0062	3	60	79	FGVPPDRFGSGSGTDFTLK			
2061.9875		2061.9937	0.0062	3	60	79	FGVPPDRFGSGSGTDFTLK	101	100	
Apo AI		Q00623	652	100	24	414	100	30568,7	5,64	
Calc. Mass.		Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
827.437		827.4464	0.0094	11	177	183	THVDSLRL			
843.4682		843.4785	0.0103	12	157	163	LQELQGR			
923.4468		923.454	0.0072	8	133	139	EDVELYR			
1040.5847		1040.6108	0.0261	25	228	236	ARPAEDLR			
1040.5847		1040.6108	0.0261	25	228	236	ARPAEDLR	44	99.984	
1047.5469		1047.5597	0.0128	12	164	172	LSPVAEEFR	18	93.736	
1047.5469		1047.5597	0.0128	12	164	172	LSPVAEEFR			

	1066.484	1066.496	0.012	11	93	100	DFWDNLEK				
	1099.6218	1099.6372	0.0154	14	155	163	QKLQELQGR				
	1099.6218	1099.6372	0.0154	14	155	163	QKLQELQGR	72	100		
	1114.5786	1114.5895	0.0109	10	175	183	MRTHVDSLRL				
	1130.5735	1130.5784	0.0049	4	175	183	MRTHVDSLRL				Oxidation (M)[1]
	1179.6005	1179.6088	0.0083	7	133	141	EDVELYRQK				
	1237.6212	1237.636	0.0148	12	131	139	WKEDVELYR	69	100		
	1237.6212	1237.636	0.0148	12	131	139	WKEDVELYR				
	1240.6208	1240.6327	0.0119	10	36	46	DFANVYVDAVK				
	1266.6365	1266.6436	0.0071	6	120	129	VQPYLDEFQK				
	1297.6318	1297.6465	0.0147	11	184	194	TQLAPHSEQMR				
	1313.6267	1313.6362	0.0095	7	184	194	TQLAPHSEQMR				Oxidation (M)[10]
	1315.6749	1315.6613	-0.0136	-10	237	247	HSLMPMLETLK				Oxidation (M)[4]
	1318.6749	1318.7015	0.0266	20	164	174	LSPVAEEFRDR	46	99.991		
	1318.6749	1318.7015	0.0266	20	164	174	LSPVAEEFRDR				
	1331.6339	1331.6581	0.0242	18	206	216	SNPTLNEYHTR	60	100		
	1331.6698	1331.6581	-0.0117	-9	237	247	HSLMPMLETLK				Oxidation (M)[4,6]
	1340.7168	1340.7357	0.0189	14	142	154	VAPLGAELQESAR	41	99.971		
	1340.7168	1340.7357	0.0189	14	142	154	VAPLGAELQESAR				
	1394.7314	1394.7402	0.0088	6	120	130	VQPYLDEFQKK	66	100		
	1394.7314	1394.7402	0.0088	6	120	130	VQPYLDEFQKK				
	1467.7842	1467.7904	0.0062	4	34	46	VKDFANVYVDAVK				
	1596.8704	1596.8868	0.0164	10	142	156	VAPLGAELQESARQK				
	1655.8024	1655.8185	0.0161	10	36	50	DFANVYVDAVKDSGR				
	1852.8501	1852.8767	0.0266	14	93	106	DFWDNLEKETDWVR				
	1885.9767	1885.9805	0.0038	2	201	216	LAELKSNPTLNEYHTR				
	1997.9822	1997.9973	0.0151	8	184	200	TQLAPHSEQMRESLAQR				Oxidation (M)[10]
404	Major urinary protein 20	Q5FW60	54	99,688	7			21144,6	4,86		
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %		Modification
	1272.6543	1272,6541	-0,0002	0	165	175	ENIIDLTNANR				
	1385.7172	1385,7129	-0,0043	-3	153	164	FAQLSEEHGIVR				
	1574.7156	1574,7161	0,0005	0	129	141	DGETFQLMELYGR				Oxidation (M)[8]
	1826.9105	1826,8198	-0,0907	-50	34	48	INGEWYTIMLATDKR				Oxidation (M)[9]
	1826.9105	1826,8198	-0,0907	-50	34	48	INGEWYTIMLATDKR	2	0		Oxidation (M)[9]
	1874.0421	1874,0336	-0,0085	-5	59	74	VFVEYIHVLENSLALK				
	1896.9524	1896,9335	-0,0189	-10	114	128	TDYDNYIMIHINKK				Oxidation (M)[8]
	1965.944	1965,9413	-0,0027	-1	96	113	AGEYSVTYDGSNTFTILK				
412	Hemoglobin subunit alpha	P01942	347	100	6	296		15132,8	7,96		
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %		Modification
	1045.5023	1045,5042	0,0019	2	33	41	MFASFPTTK	32	99,79		Oxidation (M)[1]
	1045.5023	1045,5042	0,0019	2	33	41	MFASFPTTK				Oxidation (M)[1]
	1087.6259	1087,6259	0	0	92	100	LRVDPVNFK				
	1320.6827	1320,5929	-0,0898	-68	1	12	MVLSGEDKSNIK				
	1529.7343	1529,74	0,0057	4	18	32	IGGHGAEYGAEALER	135	100		
	1529.7343	1529,74	0,0057	4	18	32	IGGHGAEYGAEALER				
	1819.8762	1819,8768	0,0006	0	42	57	TYFPFHDVSHGSAQVK				
	1819.8762	1819,8768	0,0006	0	42	57	TYFPFHDVSHGSAQVK	129	100		
	2199.073	2199,0203	-0,0527	-24	42	61	TYFPFHDVSHGSAQVKGHGK				
427	Hemoglobina subunidad alpha	P01942	179	100	3	160		15132,8	7,96		
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %		Modification
	1320.6827	1320,6019	-0,0808	-61	1	12	MVLSGEDKSNIK				
	1529.7343	1529,7394	0,0051	3	18	32	IGGHGAEYGAEALER	60	100		
	1529.7343	1529,7394	0,0051	3	18	32	IGGHGAEYGAEALER				
	1819.8762	1819,8794	0,0032	2	42	57	TYFPFHDVSHGSAQVK	100	100		
	1819.8762	1819,8794	0,0032	2	42	57	TYFPFHDVSHGSAQVK				
	Hemoglobina subunidad beta1	P02088	99	100	7	38		15944,2	7,12		
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %		Modification

	1126.564	1126.5677	0.0037	3	97	105	LHVDPENFR				
	1274.7256	1274.73	0.0044	3	32	41	LLVVPWTQR				
	1274.7256	1274.73	0.0044	3	32	41	LLVVPWTQR	38	99.955		
	1294.6426	1294,639	-0,0036	-3	122	133	DFTPAQAQAFQK				
	1302.6284	1302.7053	0.0769	59	19	31	VNSDEVGGEALGR				
	1730.0145	1730.0115	-0.003	-2	106	121	LLGNMIVIVLGHHLGK				Oxidation (M)[5]
	1756.9229	1756.9241	0.0012	1	68	83	VITAFNDGLNHLDLTK				
	1996.8956	1996.9495	0.0539	27	42	60	YFDSFGDLSSAIMGNAK				Oxidation (M)[15]
	<b>Hemoglobina subunidad beta2</b>	<b>P02089</b>	<b>64</b>	<b>99,97</b>	<b>4</b>	<b>38</b>	<b>99,955</b>	<b>15982,3</b>	<b>7,85</b>		
	<b>Calc. Mass.</b>	<b>Obsrv. Mass</b>	<b>± da</b>	<b>± ppm</b>	<b>Start Seq.</b>	<b>End Seq.</b>	<b>Sequence</b>	<b>Ion Score</b>	<b>C.I. %</b>	<b>Modification</b>	
	1091.6095	1091,5856	-0,0239	-22	68	77	VITAFNEGLK				
	1091.6095	1091.5856	-0.0239	-22	68	77	VITAFNEGLK				
	1126.564	1126.5677	0.0037	3	97	105	LHVDPENFR				
	1274.7256	1274.73	0.0044	3	32	41	LLVVPWTQR				
	1274.7256	1274.73	0.0044	3	32	41	LLVVPWTQR	38	99.955		
	1294.6426	1294,639	-0,0036	-3	122	133	DFTPAQAQAFQK				
	<b>Hemoglobina subunidad epsilon Y2</b>	<b>P02104</b>	<b>50</b>	<b>99,216</b>	<b>2</b>	<b>38</b>	<b>99,955</b>	<b>16183,5</b>	<b>7,9</b>		
	<b>Calc. Mass.</b>	<b>Obsrv. Mass</b>	<b>± da</b>	<b>± ppm</b>	<b>Start Seq.</b>	<b>End Seq.</b>	<b>Sequence</b>	<b>Ion Score</b>	<b>C.I. %</b>	<b>Modification</b>	
	1274.7256	1274.73	0.0044	3	32	41	LLVVPWTQR				
	1274.7256	1274.73	0.0044	3	32	41	LLVVPWTQR	38	99.955		
	2584.3882	2584.2332	-0.155	-60	19	41	VNVEEVGGEALGRLLVVPWTQR				
430	<b>Hemoglobina subunidad beta1</b>	<b>P02088</b>	<b>507</b>	<b>100</b>	<b>10</b>	<b>401</b>	<b>100</b>	<b>15944,2</b>	<b>7,12</b>		
	<b>Calc. Mass.</b>	<b>Obsrv. Mass</b>	<b>± da</b>	<b>± ppm</b>	<b>Start Seq.</b>	<b>End Seq.</b>	<b>Sequence</b>	<b>Ion Score</b>	<b>C.I. %</b>	<b>Modification</b>	
	912.4785	912.4816	0.0031	3	2	9	VHLTDAEK				
	1126.564	1126,5629	-0,0011	-1	97	105	LHVDPENFR				
	1274.7256	1274.7344	0.0088	7	32	41	LLVVPWTQR	52	99.998		
	1274.7256	1274.7344	0.0088	7	32	41	LLVVPWTQR				
	1294.6426	1294.6456	0.003	2	122	133	DFTPAQAQAFQK				
	1730.0145	1730.0159	0.0014	1	106	121	LLGNMIVIVLGHHLGK	87	100		Oxidation (M)[5]
	1730.0145	1730.0159	0.0014	1	106	121	LLGNMIVIVLGHHLGK				Oxidation (M)[5]
	1756.9229	1756.9233	0.0004	0	68	83	VITAFNDGLNHLDLTK	117	100		
	1756.9229	1756.9233	0.0004	0	68	83	VITAFNDGLNHLDLTK				
	1885.0177	1885.0212	0.0035	2	67	83	KVITAFNDGLNHLDLTK				
	1996.8956	1996.8977	0.0021	1	42	60	YFDSFGDLSSAIMGNAK				Oxidation (M)[15]
	1996.8956	1996.8977	0.0021	1	42	60	YFDSFGDLSSAIMGNAK	145	100		Oxidation (M)[15]
	2572.2249	2572.2249	0	0	84	105	GTAFSLSELHCDKLHVDPENFR				Carbamidomethyl (C)[11]
	3005.6392	3005.6431	0.0039	1	106	133	LLGNMIVIVLGHHLGKFTPAQAQAFQK				Oxidation (M)[5]
	<b>Hemoglobina subunidad beta2</b>	<b>P02089</b>	<b>89</b>	<b>100</b>	<b>5</b>	<b>52</b>	<b>99,998</b>	<b>15982,3</b>	<b>7,85</b>		
	<b>Calc. Mass.</b>	<b>Obsrv. Mass</b>	<b>± da</b>	<b>± ppm</b>	<b>Start Seq.</b>	<b>End Seq.</b>	<b>Sequence</b>	<b>Ion Score</b>	<b>C.I. %</b>	<b>Modification</b>	
	912.4785	912.4816	0.0031	3	2	9	VHLTDAEK				
	1126.564	1126,5629	-0,0011	-1	97	105	LHVDPENFR				
	1274.7256	1274.7344	0.0088	7	32	41	LLVVPWTQR	52	99.998		
	1274.7256	1274.7344	0.0088	7	32	41	LLVVPWTQR				
	1294.6426	1294.6456	0.003	2	122	133	DFTPAQAQAFQK				
	2572.2249	2572.2249	0	0	84	105	GTAFSLSELHCDKLHVDPENFR				Carbamidomethyl (C)[11]
	<b>Hemoglobina subunidad epsilon Y2</b>	<b>P02104</b>	<b>63</b>	<b>99,957</b>	<b>2</b>	<b>55</b>	<b>99,999</b>	<b>16183,5</b>	<b>7,9</b>		
	<b>Calc. Mass.</b>	<b>Obsrv. Mass</b>	<b>± da</b>	<b>± ppm</b>	<b>Start Seq.</b>	<b>End Seq.</b>	<b>Sequence</b>	<b>Ion Score</b>	<b>C.I. %</b>	<b>Modification</b>	
	1274.7256	1274.7344	0.0088	7	32	41	LLVVPWTQR	52	99.998		
	1274.7256	1274.7344	0.0088	7	32	41	LLVVPWTQR				
	2097.0684	2097,062	-0,0064	-3	1	18	MVNFTAEEKTLINGLWSK				Oxidation (M)[1]
438	<b>Protrombina</b>	<b>P19221</b>	<b>369</b>	<b>100</b>	<b>7</b>	<b>343</b>	<b>100</b>	<b>71649,2</b>	<b>6,04</b>		
	<b>Calc. Mass.</b>	<b>Obsrv. Mass</b>	<b>± da</b>	<b>± ppm</b>	<b>Start Seq.</b>	<b>End Seq.</b>	<b>Sequence</b>	<b>Ion Score</b>	<b>C.I. %</b>	<b>Modification</b>	
	937.4559	937.4583	0.0024	3	259	265	LVENFCR				Carbamidomethyl (C)[6]
	937.4559	937.4583	0.0024	3	259	265	LVENFCR	54	99.999		Carbamidomethyl (C)[6]
	1140.5208	1140,5192	-0,0016	-1	250	258	YQDFDPEVK	65	100		
	1140.5208	1140,5192	-0,0016	-1	250	258	YQDFDPEVK				
	1542.6199	1542.7571	0.1372	89	558	572	GDACEGDSGGPFVVK				Carbamidomethyl (C)[4], Oxidation (M)[14]

	1569.7795	1569.7836	0.0041	3	246	258	TLSKYQDFDPEVK			
	1599,7795	1599,7812	0,0017	1	206,00	219,00	DNLSPPPLGQCLTER	11	100	Carbamidomethyl (C)[10]
	1599,7795	1599,7812	0,0017	1	206,00	219,00	DNLSPPPLGQCLTER			Carbamidomethyl (C)[10]
	2015.9814	2015.9852	0.0038	2	201	219	SGGSKDNLSPPPLGQCLTER	124	100	Carbamidomethyl (C)[15]
	2015.9814	2015.9852	0.0038	2	201	219	SGGSKDNLSPPPLGQCLTER			Carbamidomethyl (C)[15]
	2600.354	2600,3523	-0,0017	-1	222	245	LYQGNLAVTTLGSPLPWNSLPAK			Carbamidomethyl (C)[15]
444	Beta 2 microglobulina	P01887	69	99,99	3	49	99,996	13928	7,79	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	10.915.844	10.915.802	-0.0042	4	24,00	32,00	TPQIQVYSR	49	99996	
	10.915.844	10.915.802	-0.0042	4	24,00	32,00	TPQIQVYSR			
	11.575.619	1.157.582	0,0201	17	102,00	111,00	VKHDSMAEPK			Oxidation (M)[6]
	34.677.351	34.677.812	0,0461	13	33,00	61,00	HPPENGNPILNCYVTFHPPHIEIQLMK			Carbamidomethyl (C)[13], Oxidation (M)[27]
450	Beta 2 microglobulina	P01887	79	99,999	1	74	100	13928	7,79	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	10.915.844	1.091.593	0,0086	8	24,00	32,00	TPQIQVYSR			
	10.915.844	1.091.593	0,0086	8	24,00	32,00	TPQIQVYSR	74	100	
452	Proteína Sérica Amiloide A1	P05366	128	100	5	89	100	13875,6	6,5	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	11.305.265	11.305.273	0.0008	1	81,00	89,00	EAFQEFFGR	64	100	
	11.305.265	11.305.273	0.0008	1	81,00	89,00	EAFQEFFGR			
	11.375.436	11.375.465	0.0029	3	49,00	57,00	NSDKYFHAR			
	16.587.921	16.587.926	0.0005	0	76,00	89,00	ISDGREAFQEFFGR	25	99	
	16.587.921	16.587.926	0.0005	0	76,00	89,00	ISDGREAFQEFFGR			
	18.039.025	18.039.375	0,035	19	106,00	121,00	SGKDPNYRPPGLPDK			
	18.468.831	18.468.949	0,0118	6	58,00	75,00	GNYDAAQRGGVWAAEK			
454	Proteína Sérica Amiloide A2	P05367	77	99,998	2	66	100	13727,5	6,41	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	11.465.214	11.465.255	0.0041	4	81,00	89,00	ESFQEFFGR	66	100	
	11.465.214	11.465.255	0.0041	4	81,00	89,00	ESFQEFFGR			
	17.599.126	17.599.043	-0.0083	-5	106,00	121,00	SGKDPNYRPPGLPAK			
489	Apo E	P08226	98	100	7	70	100	35901,4	5,56	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	10.755.895	10.755.896	0.0001	0	262,00	270,00	LQAEIFQAR			
	10.755.895	10.755.896	0.0001	0	262,00	270,00	LQAEIFQAR	70	100	
	1178.547	11.785.764	0.0294	25	253,00	261,00	MEEQTQQIR			Oxidation (M)[1]
	12.286.393	12.286.428	0.0035	3	226,00	236,00	GRLEEVGNQAR			
	1.393.674	13.936.912	0.0172	12	251,00	261,00	SKMEEQTQQIR			Oxidation (M)[3]
	15.108.085	15.108.037	-0.0048	-3	202,00	216,00	TANLGAGAAQLRDR			
	18.269.242	18.268.075	-0.1167	-67	87,00	102,00	ELEEQLGPVAETRAR			
	18.269.242	18.268.075	-0.1167	-67	87,00	102,00	ELEEQLGPVAETRAR			
	1994,0553	19.939.966	-0.0587	-29	293,00	311,00	IQASVATNPIITPVAQENQ			
499	Fosfatidilinositol-glican-especifica fosfolipasa D	O70362	237	100	13	179	100	93766,6	6,65	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	9.515.257	9.515.259	0.0002	0	797,00	805,00	FGSSLVSVR			
	9.515.257	9.515.259	0.0002	0	797,00	805,00	FGSSLVSVR	50	100	
	11.065.953	11.065.544	-0.0409	-37	42,00	50,00	LQDGRINRYK			
	11.285.836	11.285.833	-0.0003	0	620,00	628,00	VYGYFLPNR	46	99992	
	11.285.836	11.285.833	-0.0003	0	620,00	628,00	VYGYFLPNR			
	11.396.055	11.395.988	-0.0067	-6	643,00	653,00	LGTSLSGYVR			
	13.826.587	13.826.532	-0.0055	-4	825,00	837,00	LSGALHVYFSSD			
	13.927.118	13.926.824	-0.0294	-21	698,00	710,00	TQPALLSTFGDR			
	14.087.067	14.087.008	-0.0059	-4	784,00	796,00	AQYVLTSPASSR			
	14.087.067	14.087.008	-0.0059	-4	784,00	796,00	AQYVLTSPASSR	83	100	
	15.138.162	1.513.812	-0.0042	-3	616,00	628,00	SLGKVYGYFLPNR			
	15.488.129	15.488.119	-0.001	-1	698,00	711,00	TQPALLSTFGDRR			
	1.666.804	16.668.052	0.0012	1	675,00	689,00	MAFLTMLHQGGATR			Oxidation (M)[1,6]
	19.588.875	19.588.875	0	0	755,00	771,00	VYIYNGMYTTLGDMTGK			Oxidation (M)[7,14]

	27.423.655	27.423.672	0.0017	1	715,00	739,00	FGSVLHLTLDLDDGLDEIIMAAPLR			Oxidation (M)[20]
	27.482.717	27.482.632	-0.0085	-3	201,00	223,00	DVLVDCTYLQFLEMHGEMFAVSK			Carbamidomethyl (C)[6], Oxidation (M)[14]
502	lg kappa chain V-II region 26-10	P01631	211	100	3	187	100	12379,3	9,04	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	13.036.165	13.036.161	-0.0004	0	67,00	79,00	FSGSGSGDTFTLK	90	100	
	13.036.165	13.036.161	-0.0004	0	67,00	79,00	FSGSGSGDTFTLK			
	20.619.875	20.619.922	0.0047	2	60,00	79,00	FSGVPDRFSGSGSGDTFTLK	97	100	
	20.619.875	20.619.922	0.0047	2	60,00	79,00	FSGVPDRFSGSGSGDTFTLK			
	25.902.852	25.902.908	0.0056	2	1,00	24,00	DVVMQTPLSLPVLGDDQASISCR			Carbamidomethyl (C)[23], Oxidation (M)[4]
	lg kappa chain C region	P01837	160	100	4	127	100	11941,6	5,23	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	9.905.002	9.905.003	0.0001	0	40,00	47,00	WKIDGSER			
	9.905.002	9.905.003	0.0001	0	40,00	47,00	WKIDGSER	52	100	
	13.475.747	13.475.764	0.0017	1	81,00	91,00	HNSYTCEATHK			Carbamidomethyl (C)[6]
	15.917.347	15.917.583	0.0236	15	48,00	61,00	QNGVLNSWTDQDSK			
	2.243.002	22.430.059	0.0039	2	62,00	80,00	DSTYSMSSTLTLTKDEYER	75	100	Oxidation (M)[6]
	2.243.002	22.430.059	0.0039	2	62,00	80,00	DSTYSMSSTLTLTKDEYER			Oxidation (M)[6]
508	Albúmina Sérica	P07724	990	100	30	695	100	70700,5	5,75	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	9.565.345	9.565.386	0.0041	4	98,00	105,00	LCAIPNLR			Carbamidomethyl (C)[2]
	10.195.784	10.195.779	-0.0005	0	234,00	242,00	AFKAWAVAR			
	1.149.615	11.496.119	-0.0031	-3	66,00	75,00	LVQEVDFAK			
	11.784.929	11.785.292	0.0363	31	461,00	469,00	CCTLPEDQR			Carbamidomethyl (C)[1,2]
	12.505.801	12.505.778	-0.0023	-2	35,00	44,00	YNDLGEQHFK			
	12.997.056	12.997.045	-0.0011	-1	362,00	372,00	HPDYSVSLLLR			
	14.397.853	14.397.908	0.0055	4	439,00	452,00	APQVSTPTLVEAAR	102	100	
	14.397.853	14.397.908	0.0055	4	439,00	452,00	APQVSTPTLVEAAR			
	14.476.191	14.476.172	-0.0019	-1	287,00	298,00	YMCENQATISSK			Carbamidomethyl (C)[3], Oxidation (M)[2]
	14.558.066	14.558.068	0.0002	0	361,00	372,00	RHPDYSVSLLLR			
	14.558.066	14.558.068	0.0002	0	361,00	372,00	RHPDYSVSLLLR	57	100	
	14.797.954	14.798.147	0.0193	13	422,00	434,00	LGEYGFQNAILVR	57	99999	
	14.797.954	14.798.147	0.0193	13	422,00	434,00	LGEYGFQNAILVR			
	16.097.897	16.097.953	0.0056	3	348,00	360,00	DVFLGTFLYEYSR	106	100	
	16.097.897	16.097.953	0.0056	3	348,00	360,00	DVFLGTFLYEYSR			
	16.628.519	16.628.562	0.0043	3	470,00	483,00	LPCVEDYLSAILNR			Carbamidomethyl (C)[3]
	16.818.431	1.681.839	-0.0041	-2	243,00	257,00	LSQTFPNADFAEITK	105	100	
	16.818.431	1.681.839	-0.0041	-2	243,00	257,00	LSQTFPNADFAEITK			
	17.147.966	17.148.008	0.0042	2	118,00	130,00	QEPERNECFLQHK			Carbamidomethyl (C)[8]
	18.667.708	18.667.755	0.0047	3	570,00	584,00	TVMDDFAQFLDTCCCK			Carbamidomethyl (C)[13,14], Oxidation (M)[3]
	1.876.995	18.769.897	-0.0053	-3	484,00	499,00	VCLLHEKTPVSEHVTK			Carbamidomethyl (C)[2]
	18.829.368	18.829.446	0.0078	4	509,00	524,00	RPCFSALTVEITYVPK			Carbamidomethyl (C)[3]
	18.829.368	18.829.446	0.0078	4	509,00	524,00	RPCFSALTVEITYVPK	61	100	Carbamidomethyl (C)[3]
	19.018.962	19.019.044	0.0082	4	153,00	168,00	ENPTTFMGHYLHEVAR			
	19.178.912	19.178.923	0.0011	1	153,00	168,00	ENPTTFMGHYLHEVAR			Oxidation (M)[7]
	19.550.531	1.955.053	-0.0001	0	89,00	105,00	SLHTLFGDKLCAIPNLR			Carbamidomethyl (C)[11]
	19.600.498	19.600.554	0.0056	3	435,00	452,00	YTQKAPQVSTPTLVEAAR			
	19.600.498	19.600.554	0.0056	3	435,00	452,00	YTQKAPQVSTPTLVEAAR	93	100	
	19.819.283	19.819.323	0,004	2	585,00	602,00	AADKDTCFSTEGPNLVTR			Carbamidomethyl (C)[7]
	21.400.015	21.400.222	0.0207	10	58,00	75,00	CSYDEHAKLVQEVDFAK			Carbamidomethyl (C)[1]
	2.153.022	21.530.381	0.0161	7	528,00	545,00	AETFTFHSIDICTLPEKEK			Carbamidomethyl (C)[11]
	22.861.077	22.861.267	0,019	8	342,00	360,00	NYAEAKDVFLGTFLYEYSR			
	22.871.428	22.871.406	-0.0022	-1	509,00	527,00	RPCFSALTVEITYVPKEFK			Carbamidomethyl (C)[3]
	23.970.996	23.971.047	0.0051	2	98,00	117,00	LCAIPNRENYGELADCCCK			Carbamidomethyl (C)[2,17,18]
	25.032.285	25.032.437	0.0152	6	414,00	434,00	TNCDLYEKLGEYGFQNAILVR	116	100	Carbamidomethyl (C)[3]
	25.032.285	25.032.437	0.0152	6	414,00	434,00	TNCDLYEKLGEYGFQNAILVR			Carbamidomethyl (C)[3]
	25.541.226	25.541.211	-0.0015	-1	131,00	152,00	DDNPSLPPFERPEAEAMCTSFK			Carbamidomethyl (C)[18], Oxidation (M)[17]
	28.223.269	28.223.179	-0.009	-3	461,00	483,00	CCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNR			Carbamidomethyl (C)[1,2,12]

518	2.950.342	29.503.562	0.0142	5	384,00	409,00	CCAEANPPACYGTVLAEFQPLVVEPK			Carbamidomethyl (C)[1,2,10]
	Antitrombina-III	P32261	166	100	12	91	100	52483,8	6,1	
	Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
	917.5203	917.5405	0.0202	22	80	86	RVWELSK			
	1179.5388	1179.5977	0.0589	50	2	14	YSPGAGSGAAGER			
	1189.6323	1189,5801	-0,0522	-44	81	90	VWELSKANSR			
	1189.6323	1189,5801	-0,0522	-44	81	90	VWELSKANSR			
	1198.7418	1198,7384	-0,0034	-3	437	446	ANRPFLLVLR			
	1307.6338	1307.6746	0.0408	31	2	15	YSPGAGSGAAGERK			
	1340.6633	1340.6667	0.0034	3	148	158	TSDQIHFFFAK			
	1340.6633	1340.6667	0.0034	3	148	158	TSDQIHFFFAK	45	99.988	
	1359.709	1359.705	-0.004	-3	47	57	DIPVNPICIYR			Carbamidomethyl (C)[8]
	1359.709	1359.705	-0.004	-3	47	57	DIPVNPICIYR	46	99,991	Carbamidomethyl (C)[8]
1379.7351	1379,7266	-0,0085	-6	447	458	EVALNTIIFMGR			Oxidation (M)[10]	
1438.6743	1438.6997	0.0254	18	1	15	MYPGAGSGAAGERK				
1700.8602	1700,8577	-0,0025	-1	203	216	LQPLDFKENPEQSR				
2337.1567	2337.1631	0.0064	3	404	426	AFLEVNEEGSEAAASTSVITGR				
2345.1885	2345.1912	0.0027	1	382	403	SQLPVAGGRDDLVSDFAHK				
Protrombina	P19221	132	100	10	96	100	71649,2	6,04		
Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification	
902.4842	902.4861	0.0019	2	498	505	VTGWGNLR	46	99.99		
902.4842	902.4861	0.0019	2	498	505	VTGWGNLR				
917.5414	917,5405	-0,0009	-1	484	491	QTVTSLLR				
1189.5789	1189.5801	0.0012	1	597	605	YGFYTHVFR				
1189.5789	1189.5801	0.0012	1	597	605	YGFYTHVFR	50	99.997		
1265.6022	1265.6135	0.0113	9	450	458	YNWRENLR				
1299.7267	1299,6639	-0,0628	-48	454	464	ENLDRDIALLK				
1333.7085	1333,7074	-0,0011	-1	370	380	GIAPWQVMLFR	1	0	Oxidation (M)[8]	
1333.7085	1333,7074	-0,0011	-1	370	380	GIAPWQVMLFR			Oxidation (M)[8]	
1374.6953	1374,6925	-0,0028	-2	595	605	GKYGFYTHVFR				
1638.7727	1638.8586	0.0859	52	96	108	KPRETFMDCLEGR			Carbamidomethyl (C)[9]	
1645.8214	1645,8191	-0,0023	-1	382	396	SPQELLCGASLISDR			Carbamidomethyl (C)[7]	
2345.2109	2345,1912	-0,0197	-8	361	380	IVEGWDAEKGAPWQVMLFR				
546	Proteasoma subunidad beta tipo-3	Q9R1P1	122	100	8	73	100	23234,6	6,15	
Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification	
11.956.833	11.956.798	-0.0035	-3	69,00	77,00	FRLNLYELK				
14.756.691	14.757.816	0.1125	76	2,00	15,00	SIMSYNGGAVMAMK			Oxidation (M)[3]	
16.297.941	16.297.928	-0.0013	-1	28,00	41,00	FGIAQMVTTDFQK			Oxidation (M)[7]	
16.386.995	16.388.176	0.1181	72	1,00	15,00	MSIMSYNGGAVMAMK			Oxidation (M)[1,4,12]	
17.668.999	17.668.983	-0.0016	-1	100,00	115,00	FGPYTEPVIAGLDPK	73	100		
17.668.999	17.668.983	-0.0016	-1	100,00	115,00	FGPYTEPVIAGLDPK				
18.238.158	18.239.397	0.1239	68	1,00	17,00	MSIMSYNGGAVMAMKMK			Oxidation (M)[1,4,12]	
1889.0491 0 49 66	18.890.483	-0.0008	0	49,00	66,00	LYGLAGLATDVQTVQAR				
23.302.246	23.302.275	0.0029	1	81,00	99,00	QIKPYTLMSMVANLLYEKR			Oxidation (M)[8,10]	
614	Complemento C4-B	P01029	359	100	21	287	100	194417,2	7,38	
Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification	
849.3995	849.4246	0.0251	30	712	717	RTCEQR			Carbamidomethyl (C)[3]	
967.4665	967,4664	-0,0001	0	94	101	SCGLFDLR			Carbamidomethyl (C)[2]	
968.5523	968,5187	-0,0336	-35	457	465	LTVQAPPSR				
1108.6038	1108,59	-0,0138	-12	234	242	YVLPNFEVK				
1130.5887	1130,5815	-0,0072	-6	1717	1725	HRAACFQLK			Carbamidomethyl (C)[5]	
1139.6207	1139,6052	-0,0155	-14	156	164	YRVFALDQK				
1148.6093	1148,5521	-0,0572	-50	1322	1332	ALNVTLSMGR				
1189.4976	1189.5903	0.0927	78	578	586	EYRNADMMK			Oxidation (M)[7,8]	
1210.5885	1210,5789	-0,0096	-8	282	291	FALMDEQKGR			Oxidation (M)[4]	
1236.6986	1236,6978	-0,0008	-1	233	242	KYVLPNFEVK				
1277.6089	1277,6002	-0,0087	-7	511	521	GQIMAMGREPR			Oxidation (M)[4,6]	

617

1328.6844	1328.6814	-0.003	-2	360	371	FVSSAFSLDLSR			
1401.7372	1401,7325	-0,0047	-3	466	478	GTGFLSIEPLDPR	45	99,99	
1401.7372	1401,7325	-0,0047	-3	466	478	GTGFLSIEPLDPR			
1430.8365	1430,8298	-0,0067	-5	443	456	LLVSAGSLYPAIAR			
1430.8365	1430,8298	-0,0067	-5	443	456	LLVSAGSLYPAIAR	59	100	
1522.786	1522,7793	-0,0067	-4	122	135	ATETQGVNLLFSSR			
1522.786	1522,7793	-0,0067	-4	122	135	ATETQGVNLLFSSR	98	100	
1532.843	1532.807	-0.036	-23	911	925	VVARGVFDLGDVSK			
1614.8638	1614,8607	-0,0031	-2	268	281	YIYGKPVQGVAYTR	85	100	
1614.8638	1614,8607	-0,0031	-2	268	281	YIYGKPVQGVAYTR			
1687.9126	1687,8962	-0,0164	-10	315	329	DQFQAALDKINIGVR			
1969.9879	1969.9819	-0.006	-3	137	153	GHIFVQTDQPIYNPGQR			
2126.0889	2126,0835	-0,0054	-3	136	153	RGHIFVQTDQPIYNPGQR			
2225.1575	2225,1167	-0,0408	-18	137	155	GHIFVQTDQPIYNPGQRVR			
Complemento C4-B	P01029	248	100	21	175	100	194417,2	7,38	

Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
9.674.665	9.674.692	0.0027	3	94,00	101,00	SCGLFDLR			Carbamidomethyl (C)[2]
9.685.523	9.685.179	-0.0344	-36	457,00	465,00	LTVQAPPSR			
10.355.106	10.355.809	0.0703	68	315,00	323,00	DQFQAALDK			
1.042.535	10.424.674	-0.0676	-65	613,00	621,00	SHKPLDMSK			
1.042.535	10.424.674	-0.0676	-65	613,00	621,00	SHKPLDMSK			
11.086.038	11.085.929	-0.0109	-10	234,00	242,00	YVLPNFEVK			
11.305.887	11.305.865	-0.0022	-2	1717,00	1725,00	HRAACFQLK			Carbamidomethyl (C)[5]
11.396.207	11.396.158	-0.0049	-4	156,00	164,00	YRVFALDQK			
11.486.093	11.485.504	-0.0589	-51	1322,00	1332,00	ALNVTLSSMGR			
11.894.976	11.895.779	0.0803	68	578,00	586,00	EYRNADMMK			Oxidation (M)[7,8]
12.105.885	12.105.856	-0.0029	-2	282,00	291,00	FALMDEQKGR			Oxidation (M)[4]
13.286.844	13.286.761	-0.0083	-6	360,00	371,00	FVSSAFSLDLSR			
14.017.372	14.017.391	0.0019	1	466,00	478,00	GTGFLSIEPLDPR			
14.308.365	14.308.403	0.0038	3	443,00	456,00	LLVSAGSLYPAIAR			
14.308.365	14.308.403	0.0038	3	443,00	456,00	LLVSAGSLYPAIAR	61	100	
1.522.786	15.227.853	-0.0007	0	122,00	135,00	ATETQGVNLLFSSR	77	100	
1.522.786	15.227.853	-0.0007	0	122,00	135,00	ATETQGVNLLFSSR			
1.532.843	15.328.137	-0.0293	-19	911,00	925,00	VVARGVFDLGDVSK			
16.148.638	16.148.695	0.0057	4	268,00	281,00	YIYGKPVQGVAYTR			
16.148.638	16.148.695	0.0057	4	268,00	281,00	YIYGKPVQGVAYTR	37	100	
16.879.126	16.879.229	0.0103	6	315,00	329,00	DQFQAALDKINIGVR			
19.699.879	19.699.913	0.0034	2	137,00	153,00	GHIFVQTDQPIYNPGQR			
21.260.889	21.260.876	-0.0013	-1	136,00	153,00	RGHIFVQTDQPIYNPGQR			
21.900.972	21.900.942	-0.003	-1	165,00	183,00	MRPSTDFLTITVENSHGLR			Oxidation (M)[1]
22.251.575	22.251.248	-0.0327	-15	137,00	155,00	GHIFVQTDQPIYNPGQRVR			

Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
9.034.318	9.034.341	0.0023	3	121,00	129,00	DGFSGPAPR			
11.205.602	11.205.557	-0.0045	-4	21,00	30,00	NLVAMGCLAR			Carbamidomethyl (C)[7], Oxidation (M)[5]
11.485.518	11.485.504	-0.0014	-1	301,00	309,00	EFVCTVTHR			Carbamidomethyl (C)[4]
11.856.738	11.855.568	-0.117	-99	200,00	209,00	VDRGLTLFK			
12.766.466	12.766.519	0.0053	4	300,00	309,00	KEFVCTVTHR			Carbamidomethyl (C)[5]
1319.757 -9 65 76	13.197.445	-0.0125	-9	65,00	76,00	YLATSQVLLSPK			
13.307.631	13.307.684	0.0053	4	328,00	339,00	HPPAVYLLPPAR	53	100	
13.307.631	13.307.684	0.0053	4	328,00	339,00	HPPAVYLLPPAR			
15.056.802	15.056.895	0.0093	6	287,00	299,00	GVASVCVEDWNNR			Carbamidomethyl (C)[6]
1.512.725	15.12.72	-0.005	-3	77,00	89,00	SILEGSDEYLVCK			Carbamidomethyl (C)[12]
16.038.228	1.603.827	0.0042	3	356,00	369,00	GFSPADISVQWLQR			
1.633.775	16.337.899	0.0149	9	287,00	300,00	GVASVCVEDWNNRK			Carbamidomethyl (C)[6]
17.498.905	17.498.839	-0.0066	-4	155,00	170,00	LVESGFTDPVTIENK			
25.104.031	25.104.136	0.0105	4	318,00	339,00	FISKPNEVHKHPPAVYLLPPAR			



lg mu chain C region membrane-bound form	P01873	134	100	13	53	99,999	53120,9	5,98	
Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
9.034.318	9.034.341	0.0023	3	121,00	129,00	DGFSGPAPR			
11.205.602	11.205.557	-0.0045	-4	21,00	30,00	NLVAMGCLAR			Carbamidomethyl (C)[7], Oxidation (M)[5]
1148.5518 -1 301 309	11.485.504	-0.0014	-1	301,00	309,00	EFVCTVTHR			Carbamidomethyl (C)[4]
1185.6738 -99 200 209	11.855.568	-0.117	-99	200,00	209,00	VDHRGLTFLK			
12.766.466	12.766.519	0.0053	4	300,00	309,00	KEFVCTVTHR			Carbamidomethyl (C)[5]
1.319.757	13.197.445	-0.0125	-9	65,00	76,00	YLATSQVLLSPK			
13.307.631	13.307.684	0.0053	4	328,00	339,00	HPPAVYLLPPAR	53	100	
13.307.631	13.307.684	0.0053	4	328,00	339,00	HPPAVYLLPPAR			
15.056.802	15.056.895	0.0093	6	287,00	299,00	GVASVCVEDWNNR			Carbamidomethyl (C)[6]
1.512.725	1512.72	-0.005	-3	77,00	89,00	SILEGSDEYLVCK			Carbamidomethyl (C)[12]
16.038.228	1.603.827	0.0042	3	356,00	369,00	GFSPADISVQWLQR			
1.633.775	16.337.899	0.0149	9	287,00	300,00	GVASVCVEDWNNRK			Carbamidomethyl (C)[6]
7.498.905	17.498.839	-0.0066	-4	155,00	170,00	LVESGFTDPVTIENK			
25.104.031	25.104.136	0.0105	4	318,00	339,00	FISKPNEVHKHPPAVYLLPPAR			
Complemento C3	P01027	79	99,999	15	49	99,996	187904,3	6,39	
Calc. Mass.	Obsrv. Mass	± da	± ppm	Start Seq.	End Seq.	Sequence	Ion Score	C.I. %	Modification
8.334.879	833.485	-0.0029	-3	835,00	841,00	LPYSVVR	49	100	
8.334.879	833.485	-0.0029	-3	835,00	841,00	LPYSVVR			
8.454.264	8.454.305	0.0041	5	1255,00	1260,00	WLNEQR			
8.824.832	8.824.843	0.0011	1	849,00	855,00	AVLFNYR			
1.055.552	10.555.464	-0.0056	-5	1052,00	1060,00	GYTQQLAFK			
11.085.746	11.085.929	0.0183	17	682,00	691,00	AGQYTDKGLR			
1.130.584	11.305.865	0.0025	2	1245,00	1254,00	DFDSVPPVVR			
12.105.813	12.105.856	0.0043	4	489,00	497,00	YYTYLVMNK			Oxidation (M)[7]
12.926.304	12.926.233	-0.0071	-5	814,00	824,00	GICVADPYEIR			Carbamidomethyl (C)[3]
12.996.401	12.996.436	0.0035	3	825,00	834,00	VMQDFIDLK			Oxidation (M)[2]
14.797.665	14.797.925	0.026	18	487,00	497,00	IRYYTYLVMNK			Oxidation (M)[9]
15.328.219	15.328.137	-0.0082	-5	914,00	927,00	AAVFNHFISDGVKK			
1638.8485 0 849 861	16.388.492	0.0007	0	849,00	861,00	AVLFNYREQEELK			
17.308.378	17.308.386	0.0008	0	1156,00	1171,00	DICEGQVNSLPGSINK			Carbamidomethyl (C)[3]
17.500.472	17.498.839	-0.1633	-93	163,00	178,00	TVVILIETPDGIPVKR			
1.886.923	18.869.226	-0.0004	0	749,00	764,00	SELEEDIPEEDIISR			

