

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



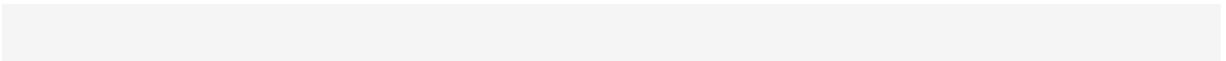
Las moléculas HLA-DR que expresan alelos del epítipo compartido, favorecen la presentación de péptidos de alta afinidad derivados de proteínas en tejido y fluido sinovial de pacientes con Artritis Reumatoide

MARIA ASUNCIÓN BELTRÁN VIDELA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN INMUNOLOGÍA

Director de Tesis: Dr. DIEGO CATALÁN M.

2016



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



Las moléculas HLA-DR que expresan alelos del epítipo compartido, favorecen la presentación de péptidos de alta afinidad derivados de proteínas en tejido y fluido sinovial de pacientes con Artritis Reumatoide

MARÍA ASUNCIÓN BELTRÁN VIDELA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN INMUNOLOGÍA

Director de Tesis: Dr. DIEGO CATALÁN M.

2016

**“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.
Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico; es también un niño
colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento
de hadas”**

Marie Curie

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a mi familia:

A mi esposo Ulpiano, quién tuvo la paciencia y entendió que este proyecto era algo importante para mí. Por enseñarme que amar es un acto de generosidad. Por tu apoyo constante y tu alegría.

A mis niños Lorenzo y Leonel, por ser mi inspiración constante, mi fuente de felicidad, porque siempre me esperan con los brazos abiertos al llegar a casa.

A mis padres, mi hermana y tía Erna, porque me enseñaron el compromiso en lo que realizas, el esfuerzo y la capacidad de soñar.

Agradecimientos

Al Dr. Diego Catalán, por abrir las puertas de su laboratorio y poder desarrollar este proyecto. Por la paciencia y entender a una tesista mamá-trabajadora. Por su capacidad de compartir sus conocimientos y ser un tutor de verdad.

A Verónica Ramos, por su ayuda, cariño y generosidad. Sin ella no hubiese podido realizar todo el trabajo. Por tu alegría y sentido del humor, gracias amiga.

A Roberto Zúñiga, quién en los inicios de este proyecto me enseñó a preparar geles, columnas de afinidad, wb, etc. Se agradece su paciencia y amistad.

Juanita, Ruth y Nancy que a través de su trabajo ayudan y permiten que muchos estudiantes podamos desarrollarnos, que gracias a su experiencia y sabiduría le dan un complemento a nuestra formación.

A la Dra. Ribeiro, por su capacidad de empatizar y ver que detrás de cada estudiante hay una persona con sueños. Por valorar no sólo las capacidades intelectuales sino al ser humano.

A Lorena Hoyos, Rodrigo Morales, Paulina García, Jaxaira Maggi, Javier Acuña, Alex Aravena y Ashles Perry, por ayudarme y ser unos excelentes compañeros de Laboratorio, siempre estuvieron conmigo, guardo muy lindos recuerdos de ustedes. Me hicieron sentir parte de algo.

A mis compañeros de trabajo del Laboratorio de Inmunología HCUCH, han sido mi apoyo y los tengo en mi corazón. En las buenas y en las malas estuvieron ahí, muchas veces reasignando las labores para dejarme tiempo para este proyecto. Cumplen el sentido de la amistad a toda prueba.

A mis amigos, que siempre han estado para subirme el ánimo, por ser parte incondicional de mi vida y apoyarme.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	10
RESUMEN	12
ABSTRACT	14
INTRODUCCIÓN	16
<i>Células y citoquinas involucradas en la patogenia de AR</i>	16
<i>Estructura de las moléculas MHC clase II y sus características</i>	19
<i>Influencia de los genes HLA-DR en la patogenia de la AR y proteínas citrulinadas en AR .</i>	21
<i>Identificación de péptidos presentados por moléculas HLA en Enfermedades autoinmunes.</i>	25
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO GENERAL	30
<i>Objetivos específicos</i>	30
MATERIAL Y MÉTODO	31
1. <i>Pacientes AR, Pacientes OA y Donantes sanos</i>	31
1.1 <i>Paciente AR</i>	31
1.2 <i>Paciente OA</i>	32
1.3 <i>Donante sano</i>	32
2. <i>Tejidos</i>	33
2.1 <i>Transporte de tejido</i>	33
2.2 <i>Procesamiento de tejido para espectrometría de masas</i>	33
2.3 <i>Procesamiento de tejido para microscopía de epifluorescencia</i>	33
2.4 <i>Fluido sinovial</i>	34
3. <i>Generación de CDs pulsadas con FS de paciente AR, a partir de Monocitos de donante sano</i>	34
3.1 <i>Genotipificación de donantes</i>	34
3.2 <i>Purificación de monocitos</i>	37
3.3 <i>Diferenciación de los monocitos a CDs, pulso con FS y maduración de CDS</i>	38

4. Electroforesis de proteínas	39
4.1 Gel de poliacrilamida	39
4.2 Electroforesis	39
4.3 Tinción de geles	39
5. Análisis por Western-blot	40
5.1 WB de tejido sinovial de paciente AR para evaluar la expresión de HLA-DR.	40
5.2 WB para evaluar la presencia de proteínas citrulinadas en muestras de tejido y fluido sinovial de paciente AR.	42
6. Detección de anticuerpos AAPC en fluido sinovial	43
7. Microscopia Epifluorescencia	44
7.1 Evaluación de la expresión de la molécula HLA-DR en tejido sinovial de pacientes AR y OA	44
7.2 Evaluación de la presencia de proteínas citrulinadas en tejido sinovial de pacientes con AR y OA	45
8. Citometría de Flujo	46
8.1 Evaluación de pureza de monocitos	46
8.2 Evaluación del fenotipo de las células dendríticas generadas	47
8.3 Estudio de muerte celular	47
9. Obtención de péptidos asociados a moléculas HLA-DR	48
9.1 Preparación de la columna de sefarosa	48
9.2 Purificación de péptidos desde moléculas HLA-DR de tejido sinovial y células dendríticas cargadas con fluido sinovial	49
9.2.1 Purificación de péptidos asociados a HLA-DR desde extractos de tejido sinovial de pacientes AR	49
9.2.2 Purificación de péptidos desde células dendríticas cargadas con fluido sinovial	50
10. Espectrometría de masas	51
10.1 Cromatografía en fase líquida- espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS)	51
10.2 Identificación de espectros en base de datos	52

11. Afinidad teórica	52
RESULTADOS	56
1. Péptidos asociados a HLA-DR en tejido sinovial de pacientes con AR que expresan alelos pertenecientes al EC.	56
1.1 Pacientes AR	59
1.2 Expresión de moléculas HLA-DR en tejido sinovial	59
1.3 Presencia de proteínas citrulinadas en tejido sinovial AR	61
1.4 Descripción de los péptidos asociados a moléculas HLA-DR en tejido sinovial de pacientes AR	66
1.4.1. Distribución por tamaño de los péptidos	68
1.4.2. Distribución por vía de procesamiento	69
1.4.3. Distribución por tipo de unión a la molécula HLA-DR	72
2. Peptidoma asociado a moléculas HLA-DR que presentan el EC de CD de donantes sanos pulsadas con fluido sinovial de pacientes con AR	83
2.1 Fluido Sinovial	83
2.2 Genotipificación de donantes	88
2.3 Generación de células dendríticas desde monocitos pulsadas con fluido sinovial	92
2.3.1 Purificación de monocitos	92
2.3.2 Fenotipo de células dendríticas	93
2.4 Descripción de los péptidos asociados a la molécula HLA-DR en CDs de donantes sanos cargadas con fluido sinovial de pacientes AR.	100
3.4.1 Distribución por tamaño de los péptidos	103
3.4.2 Distribución por vía de degradación	105
3.4.3 Distribución por tipo de unión	109
DISCUSIÓN	121
CONCLUSIONES	134
BIBLIOGRAFÍA	135

ABREVIATURAS

AA: Afinidad alta teórica

AAPC: Anticuerpo Anti péptido citrulinado

AB: Afinidad baja teórica

ACR: Colegio Americano de Reumatólogos

ADN: Ácido dexirribonucleico

AI: Afinidad intermedia teórica

APC: Célula presentadora de antígenos

AR: Artritis reumatoide

CCR: Quimioquina

CD: Células dendríticas

CIA: Artritis inducida por colágeno

DAS 28: Índice de actividad de la enfermedades en 28 articulaciones

EC: Epítopo compartido

EM: Espectrometría de masas

FS: Fluido sinovial

GM-CSF: Factor estimulante de colonia de granulocitos y monocitos

HLA: Antígeno leucocitario de histocompatibilidad

ID: Indeterminado

IL: Interleuquina

Linfocitos Th: Linfocitos T Helper

LPS: Lipopolisácarido

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MMP: Metaloproteínasa

MPT: Modificación post-trasduccional

NPPs: Péptidos naturalmente presentados

OA: Osteoartritis

P: Péptido o residuo de anclaje

PAD: Peptidil arginina deaminasa

PBMC: Células monucleares de sangre periférica

PCR: Reacción de la polimerasa en cadena

PCR-SSO: Reacción de amplificación en cadena de una sonda específica de secuencia.

SDS: Dodecilsulfato sódico

TNF-a: Factor de necrosis tumoral alfa

RESUMEN

Estudiamos el peptidoma asociado a la molécula HLA-DR, tanto en tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR) como en células dendríticas (CD) de donantes positivos para alelos del epítipo compartido (EC), pulsadas con fluido sinovial de pacientes AR. Estos alelos han sido extensamente estudiados, encontrándose una asociación con AR. Nosotros mediante el uso de espectrometría de masa describimos el repertorio peptídico de algunos alelos del EC, obtenidos desde tejido y CDs de donantes sanos pulsados con FS. Basándonos en el tipo de unión de estas secuencias peptídicas y su procedencia, logramos ver características propias de estos alelos, que presentaban un tipo de unión teórica más afín a las secuencias peptídicas. Esto nos permitirá en un futuro cercano el desarrollo de una búsqueda de posibles nuevos auto- antígenos para esta enfermedad.

Metodología: Se seleccionaron 3 pacientes con AR para cirugía de reemplazo articular, los cuales se genotificaron para el gen HLA-DR y de los cuales se obtuvo fluido y tejido sinovial. **Además, se reclutaron 100 donantes sanos en busca de donantes positivos para los alelos del EC.** De los donantes seleccionados se generaron CD, las que fueron pulsadas con fluido sinovial de pacientes AR. Se aislaron complejos HLA-DR/péptidos desde tejido sinovial y CD pulsadas y no pulsadas, y posteriormente se eluyeron los péptidos, los que fueron secuenciados por espectrometría de masas y analizados por herramientas bioinformáticas.

Resultados: Se obtuvieron 1176 péptidos, provenientes de 227 proteínas. La mayoría de los péptidos fueron presentados en “nested set” y derivaban de proteínas procesadas por la vía endocítica. En el caso de tejido sinovial, la mayoría de los péptidos provenía del medio extracelular, mientras que en las CD, los péptidos provenían en un 70% de membrana plasmática. Los alelos del EC DRB1*01:01 y DRB1*04:01 presentaron en tejido una mayor cantidad de péptidos de afinidad alta e intermedia por las respectivas moléculas HLA-DR. En las CD los péptidos presentados en el alelo DRB1*01:01 tenían una afinidad teórica alta por ésta molécula. No se observó la presentación de péptidos citrulinados en tejido sinovial ni en CD pulsadas y no pulsadas.

Conclusión: El peptidoma proveniente de CD cargadas con fluido sinovial de pacientes AR o de tejido sinovial de pacientes AR presentado por moléculas HLA-DR positivas para los alelos EC, presenta secuencias peptídicas con una afinidad teórica alta. Las secuencias presentadas en tejidos provienen del medio extracelular y se relacionando con proteínas inflamatorias. Las secuencias presentadas en CDs de donante sano en su mayoría provienen de membrana plasmática y se relacionan con proteínas del procesamiento y presentación antigénica.

ABSTRACT

This study involves the peptidome associated to HLA-DR molecule, in synovial tissue from Rheumatoid Arthritis (RA) patients and dendritic cells (DC) from healthy donors positive for shared epitope (SE) alleles pulsed with synovial fluid from RA patients. These alleles have been extensively studied, finding an association with RA. We using -mass spectrometric- peptide repertoire describe some alleles of EC, obtained from tissue and CD8 from healthy donors pulsed with FS. Based on the type of binding of these peptide sequences and their origin, we see own of these alleles, they exhibited one more akin to theoretical peptide sequences binding characteristics. This will enable us in the near future the development of a search for new potential autoantigens for this disease.

Methodology: 3 RA patients selected for joint replacement surgery were recruited, genotyped for HLA-DR gene, and their synovial fluid and tissue were obtained. Also, healthy donors positive for SE alleles were recruited. From the 100 selected subjects, blood samples were obtained to generate DC, which were pulsed with synovial fluid from RA patients or left unpulsed. HLA-DR/peptides complexes were isolated from tissue and cells, later the peptides which were sequenced by mass spectrometry were eluted and analyzed by bioinformatics tools.

Results: 1176 peptides from 227 parental proteins were obtained. Most peptides were presented in nested set and derived from proteins processed by the endocytic pathway. In the case of synovial tissue, most peptides derive from the extracellular medium, whereas in DC, 70% were derived from the plasma membrane.

Most peptides presented by SE alleles DRB1*01:01 and DRB1*04:01 in synovial tissue were defined as of high and intermediate affinity for their respective HLA-DR allele. In DC, the peptides presented by the allele DRB1*01:01 had a high theoretical affinity for this allele. No citrullinated peptides were detected neither in synovial tissue nor in pulsed and non-pulsed DC.

Conclusion: The peptidome associated to HLA - DR molecule of alleles SE presents peptide sequences with high theoretical affinity. The sequences presented in tissues derived from the extracellular medium and interacting with inflammatory proteins. The sequences presented in healthy donor CDs mostly come from plasma membrane proteins and are related to processing and antigen presentation.

INTRODUCCIÓN

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica que a nivel mundial afecta al 0,5 -1% de la población adulta (Wegner, 2010). En Chile su prevalencia es de 0,46%, siendo uno de los 25 primeros problemas de salud en mujeres en el tramo de edad de 45 a 74 años (MINSAL, año 2007).

Es una enfermedad de etiología desconocida y multifactorial, que se caracteriza por el compromiso simétrico de las articulaciones y por la inflamación e hiperplasia del tejido sinovial, lo que lleva al aumento de tejido granulatorio que se extiende por la superficie articular, proceso conocido como pannus (Goronzy et al., 2005). La progresión de la AR está asociada con una pérdida en el funcionamiento de la articulación, resultado de la destrucción del hueso y del cartílago mediado por un proceso inmune, provocando discapacidad y reducción de la expectativa de vida del paciente (Tak et al., 2000, Scott et al., 2010).

Células y citoquinas involucradas en la patogenia de AR

En las primeras etapas de la AR, se observa edema del tejido y posteriormente hiperplasia en la membrana sinovial con aumento de sinoviocitos tipo macrófago y tipo fibroblasto (Lee et al., 2001). El aumento de citoquinas pro-inflamatorias lleva al predominio de sinoviocitos tipo macrófago (Scott et al., 2010). Los sinoviocitos tipo fibroblasto producen IL-6, IL-8 y quimioquinas que aumentan la llegada de leucocitos a la membrana sinovial (Mor et al., 2005). Estudios posteriores han asociado la heterogeneidad de la enfermedad con cuatro fenotipos sinoviales;

linfoide, mieloide, leve inflamación y fibroide, cada uno de ellos con un perfil genético característico. En el caso del fenotipo linfoide, se observa expresión de genes relacionados con la activación y diferenciación de los linfocitos T y/o B, producción de inmunoglobulinas, sobreexpresión de la vía JAK/STAT y señalización de IL-17. Por su parte, el fenotipo mieloide se caracteriza por la expresión de genes relacionados con procesos de quimiotaxis, producción de Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) e IL-1 β , fagocitosis mediada por los receptores Fc- γ y proliferación de mononucleares. El fenotipo fibroide, en tanto, presenta un perfil genético asociado a señalización del Factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) (Dennis et al., 2014).

Los linfocitos T CD4+ “naive” pueden ser polarizados y diferenciarse en distintos subsets de linfocitos Th1, Th2, Th17, Treg, Th22, dependiendo de la citoquina que esté presente en el medio, que depende a su vez de la célula presentadora de antígeno (APC) (Abbas et al., 1996). Las células dendríticas presentan auto-antígenos a linfocitos T auto-reactivos, generando la activación y diferenciación en el órgano linfoide secundario. Estos, migran por vía sanguínea hasta el órgano blanco en donde inducen o agravan la inflamación local. (Lubberts, et al 2015)

Los linfocitos T helper 1 (Th1) están involucrados en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes, incluyendo la AR, debido a su carácter pro-inflamatorio (Notley CA et al., 2010). El uso terapéutico de inhibidores de TNF ha significado un avance importante en el manejo de la AR, dando a entender que los linfocitos Th1 están involucrados en la patogenia de esta enfermedad (Taylor PC et al., 2009). En

el modelo experimental de ratón, su rol es controversial (pro-inflamatorio y/o anti-inflamatorio), indicando que IL-23 es esencial promover la inflamación, mientras que IL-12 media la protección de la articulación (Murphy C. et al., 2003).

Los linfocitos Th17 también son mediadores claves de la inflamación en AR, lo que ha sido demostrado en modelos experimentales de artritis, como Artritis Inducida por Colágeno (CIA), en donde ratones *knock-out* para el gen de IL-17 no desarrollan inflamación (Nakae S et al., 2003). Los linfocitos Th17 secretan IL-17, IL-21, IL-22, factor estimulante de colonia granulocito-macrófago (GM-CSF) y TNF- α . Además, en su superficie expresan receptores para quimioquinas: CCR2, CCR4 y CCR6 (Sato et al., 2007). Por otro lado, contribuyen al reclutamiento de neutrófilos hacia la membrana sinovial, mediante la inducción de la producción de IL-6 e IL-18 por parte de fibroblastos y células endoteliales (Fujimoto et al., 2008, Fossiez et al., 1996). También incrementan la producción metaloproteinasas en el tejido sinovial y cartílago, como MMP-1, 2, 9 y 13 (Moran et al., 2009). En pacientes con AR, se observa un aumento en los niveles de IL-17 en sangre, mostrando una relación directa con la actividad de la enfermedad (Shen et al., 2009).

IL-22, secretada por los linfocitos Th17, se encuentra elevada en pacientes con AR en comparación a donantes sanos (Zhao et al 2013). El aumento de esta citoquina se correlaciona con erosión del hueso (Leipe et al., 2011).

Estructura de las moléculas MHC clase II y sus características

La función de las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés), es la unión de fragmentos peptídicos derivados de patógenos o proteínas propias en la superficie celular de una célula presentadora de antígenos (APC) para el reconocimiento apropiado por los linfocitos T. Los genes de este complejo se ubican en el cromosoma 6 humano y comprende alrededor de 4 mil pares de bases que contienen más de 200 genes. Es un complejo poligénico y polimórfico. Se divide en tres regiones que contiene genes clase I, clase II y clase III. Los genes clase I contiene los genes HLA-A, HLA-B y HLA-C que codifican la cadena α del heterodímero de la molécula MHC clase I. Los genes clase II contiene los genes HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ que codifican las cadenas α y β de la molécula MHC clase II. Además, en este complejo se encuentran genes relacionados con el procesamiento y presentación antigénica, como; genes del transportador TAP1 y TAP2, genes de dos sub unidades del inmunoproteosoma (LMP), genes que codifican las cadenas α y β de la molécula HLA-DM y las cadenas α y β de la molécula HLA-DO. Los genes de clase III codifican proteínas con diversas funciones inmunológica (TNF- α , C4A, C4B, linfoxinas A y B). (Janeway's Immunobiology 8 edición, 2012)

La molécula MHC clase I es un heterodímero, compuesto por una cadena α (43 kDa) que se extiende por la membrana y esta unida de manera no covalente a la cadena β -2 microglobulina. La cadena α posee tres dominios, α 1, α 2 y α 3. Los dominios α 3 y α 2, muestran una estructura similar al dominio constante (dominio C)

de las inmunoglobulinas. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ muestran una estructura que consiste en dos alfa hélices separadas que yacen en una sabana de ocho bandas beta anti-paralelas, creando una hendidura donde se ubica el péptido antigénico. Esta hendidura es cerrada y une péptidos de un largo limitado (8-10 aminoácidos). El péptido es estabilizado en los extremos N y C-terminal del surco de unión (Bjorkman et al., 2005).

La molécula MHC clase II está compuesta por dos glicoproteínas de transmembrana, α (34 kDa) y β (29 kDa). Cada cadena posee dos dominios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$, $\beta 2$). Los dominios $\alpha 2$ y $\beta 2$ se unen en una estructura similar al dominio C de las inmunoglobulinas. Los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ toman una forma similar a los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la molécula clase I (dos alfa hélices en la sabana beta plegada). La hendidura de unión al péptido es abierta y permite unir péptidos de gran tamaño (10-27aa). El péptido es estabilizado a lo largo de todo el surco de unión (Brown et al., 1993).

Dentro del surco de unión, hay residuos específicos y polimórficos llamados residuos de anclaje (Stern et al., 1994). El conjunto de residuos de anclaje recibe el nombre “motivo de unión” y es característico de cada variedad alélica. La molécula MHC de clase II contiene 9 residuos de anclaje (P1 al P9) y en ellos se ubica el centro del péptido o Core. Los residuos P1, P4, P6 y P9 se ubican dentro del surco de unión y dan especificidad y estabilidad al péptido. El residuo P1 es el más importante y recibe el nombre de residuo ancla y los aminoácidos de los péptidos que interactúan con este residuo son de característica hidrofóbica. Los aminoácidos de los péptidos que interactúan con P4 se caracterizan por su carga negativa. Los

que lo hacen con P6 en cambio, se caracterizan por ser residuos básicos y finalmente los que interactúan con P9 se caracterizan por ser residuos hidrofóbicos. Estos residuos se unen mediante unión de puente de hidrógeno a las cadenas laterales del péptido antigénico (Brown et al., 1993).

La información de cada motivo de unión de un alelo puede presentarse en forma de una matriz de afinidad en la que se indica la importancia relativa de cada aminoácido en las distintas posiciones del motivo de unión, permitiendo calcular la afinidad teórica de un determinado péptido a un alelo específico. (Sturniolo et al., 1999). En la actualidad mediante algoritmos matemáticos y métodos de modelación molecular se pueden realizar estimaciones sobre la afinidad de un péptido a determinado alelo. El programa Net MHC II pan, predice la afinidad de alelos cuyos motivos de unión no están caracterizados, utilizando la red ANN (del inglés *Artificial Neural Network*) (Lundegaard et al., 2011). El programa Propred se basa en la matriz de unión realizada por Sturniolo, tomando en cuenta los péptidos de anclaje de cada alelo, generando un “umbral”. (Singh et al., 2001). Programas basados en motivos publicados en bases de datos, como SYFPEITHY, que toma en consideración los péptidos de anclaje y las posiciones auxiliares (Rammensee et al., 1999).

Influencia de los genes HLA-DR en la patogenia de la AR y su asociación con las proteínas citrulinadas

La incidencia de AR está determinada por la susceptibilidad genética (Barton et al., 2009). Estudios en gemelos demostraron que factores genéticos aumentan entre un 50% y un 60% el riesgo de enfermar (Mac Gregor et al., 2000, Seldin et al.,

1999). El locus HLA del cromosoma 6 (6p21.3) fue establecido hacia fines de los años setenta como una región que promueve susceptibilidad a enfermedades autoinmunes. Los genes del locus HLA representan del 30% al 50% del total de la susceptibilidad genética en AR. Esta región ha mostrado una consistente asociación con AR en varios grupos étnicos (Imboden et al., 2009).

La mayoría de los pacientes con AR poseen algunos alelos del gen *HLA-DRB1* que codifican las secuencias de aminoácidos *QKRAA*, *QRRAA* y *RRRAA* en las posiciones 70-74 de la cadena DR β de la molécula HLA-DR. Estas secuencias comunes se conocen con el nombre de “Epítipo Compartido” (EC) (Gregersen et al., 1987). Los motivos del EC consisten en 3 aminoácidos homólogos dentro de una variante de secuencia: *QKRAA* variante común en población caucásica codificada por el alelo HLA-DRB1*0401; *QRRAA*, codificado por varios alelos, entre ellos HLA-DRB1*0404, HLA-DRB1*0101 y HLA-DRB1*0405.; y *RRRAA*, codificado por el alelo HLA-DRB1*1001 (De Almeida et al 2011). La secuencia del EC está situada en la pared de la hélice alfa del bolsillo de unión al péptido. En esta posición podría influenciar la unión del péptido a la molécula de HLA y por tanto la presentación al linfocito T (Bhayani et al 2001). El mecanismo bajo el cual el EC actúa en la AR no es muy claro. Basados en el rol de las moléculas MHC clase II, en la presentación de antígenos, se ha postulado la presentación de péptidos artritogénicos propios (Wucherpfenning et al 1991), mimetismo molecular con antígenos foráneos (La Cava et al., 1997) o la selección en el repertorio de los linfocitos T (Bax et al., 2011). Para definir la asociación entre la región HLA y AR e identificar potenciales variantes causales, Raychaudhuri y cols, realizaron un estudio de genoma ampliado de la

población con AR europea comparando con controles sanos. Se testearon los genes MHC clásicos y sus polimorfismos (*HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-DPB1*, *HLA-DQA1*, *HLA-DPB1* y *HLA-DRB1*) como también 3117 polimorfismos de nucleótido único (SNPs), encontrándose 3 aminoácidos en las posiciones 11, 71 y 74 en HLA-DRB1, un aminoácido en la posición 9 de la molécula HLA-B y un aminoácido en la posición 9 de la molécula HLA-DPB1, que se localizaron en el motivo de unión al péptido y que podrían explicar la asociación de MHC y riesgo de AR (Raychaudhuri et al. ,2012). Un estudio español observó esta asociación independiente del EC y evaluó la presencia de valina y leucina en la posición 11 del HLA-DRB1. Este cambio confiere un alto riesgo de progresión radiográfica independiente del EC pero no independiente de la presencia de anticuerpo anti-proteínas citrulinadas (AAPC), dando importancia a lo ya antes mencionado con respecto a los aminoácidos ubicados en la posición 11 (Van Steebergen et al., 2015). Cabe mencionar que la asociación entre alelos HLA-DRB1 con EC y AR sólo se ha observado en pacientes con AAPC (Van der Helm et al., 2005).

Las modificaciones post-traduccionales (MPT) de proteínas pueden afectar a los péptidos presentados por las moléculas MHC, alterando las distintas etapas del procesamiento y presentación antigénica y se ven influenciadas por los procesos de inflamación y apoptosis (Engelhard 2006). La citrulinación, MPT catalizada por la enzima dependiente de calcio peptidil arginina deiminasa (PAD), que convierte a arginina (de carga positiva) a citrulina (de carga neutra). Se ha identificado gran cantidad de proteínas citrulinadas en el fluido sinovial de pacientes con AR, lo cual se corresponde con los niveles de AAPC (Kinloch et al., 2008).

Las cadenas alfa y beta del fibrinógeno citrulinadas, son reconocidas de manera específica por los AACP (Hill et al., 2008). El péptido de vimentina 65-77 (SAVRAcitSSVPGVR) mostró mayor afinidad por la molécula HLA-DRB1*0401 en su estado citrulinado (Hill et al., 2003). Alfa-enolosa presenta 9 residuos citrulinados en su secuencia y ellos son reconocidos por anticuerpos presentes en el suero de pacientes AR (Kinloch et al., 2005). Finalmente, se ha demostrado la presencia de colágeno citrulinado en el fluido sinovial de pacientes con AR (Burkhardt et al., 2005)

Los AACP son auto-anticuerpos dirigidos contra proteínas citrulinadas y de presencia casi exclusiva en AR. Estos anticuerpos aparecen muchos años antes del inicio de la enfermedad (Rantapaá-Dahlgvist et al., 2003), están presentes en dos tercios de los pacientes con AR (Schellekens et al., 2000), están asociados a severidad de la enfermedad (Agrawal et al., 2007), y son un factor predictivo independiente en la progresión radiográfica de la erosión en las articulaciones (Syversen et al., 2008). La presencia de AACP antes de los signos de inflamación en la articulación sugiere que la inmunidad contra péptidos citrulinados se inicia fuera de la articulación, postulándose el pulmón como sitio de inicio de la respuesta inmune en individuos fumadores (Catrina A. 2014). Se ha demostrado que en un comienzo los AACP reconocen un solo epítipo citrulinado, para luego expandir esta reactividad hacia distintos epítopos citrulinados en un periodo cercano al inicio de los síntomas, en un proceso llamado *diversificación epitópica* (Catrina A., 2014).

La presencia de AACP está asociada a factores de tipo ambiental (fumadores) y factores de riesgo genético, como alelos *HLA-DRB1* pertenecientes al EC, como ha sido observado en distintas poblaciones de pacientes AR (Padyukov 2004, Too

2012). Existiendo una asociación directa entre la presencia de AAPC, alelos pertenecientes al EC y AR. (Ding et al., 2009). La región del EC, está ubicada dentro del bolsillo de anclaje al péptido P4, de carga positiva, e interactúa de manera directa con las cadenas laterales del péptido, de forma tal que los aminoácidos de carga neutra o negativa aumentan la afinidad por la molécula MHC. Así, el cambio de arginina a citrulina aumenta la afinidad, lo que fue demostrado en ratones transgénicos para HLA-DR*0401 (Hill et al., 2003). Asimismo, linfocitos T de pacientes con AR son capaces de reconocer tetrámeros de HLA-DR*0401 con péptidos que contienen residuos citrulinados en el bolsillo P4, y el número de linfocitos T CD4+ reactivos a estos tetrámeros se correlaciona con la actividad de la enfermedad (Scally et al., 2013), demostrando que los auto antígenos citrulinados presentan una mayor afinidad hacia los alelos del EC.

Identificación de péptidos presentados por moléculas HLA en enfermedades autoinmunes

Los estudios de caracterización de péptidos presentados por moléculas HLA-DR partieron con la utilización de líneas celulares de linfoblastos B (B-LCL), como fuente de complejos HLA-DR/péptidos, lo que permitió la identificación de motivos de unión de péptidos alelo-específicos, facilitando el desarrollo de bases de datos (Rammensee et al., 1999). El uso de la espectrometría de masas (EM) ha permitido el estudio masivo de péptidos naturalmente presentados (NPPs), asociados tanto a

moléculas MHC clase I y II, abriendo paso al análisis de epítomos virales, tumorales y auto-antigénicos (Muixí 2008).

En autoinmunidad se han publicado varios trabajos desarrollados directamente desde tejidos de pacientes con enfermedades autoinmunes, superando las limitaciones a que están sujetos los análisis desde líneas celulares (Muixí 2008). Por ejemplo, fueron descritos 55 péptidos exógenos en pacientes con enfermedad del intestino inflamado, encontrándose péptidos derivados de *E. coli* y *S. cerevisiae*, los cuales podrían participar de la patogénesis de esta enfermedad (Oshitani et al., 2003). También se ha utilizado esta técnica para el estudio de células extraídas de lavado bronqueo alveolar de pacientes con sarcoidosis que presentan moléculas HLA-DR3, en quienes se identificaron 78 péptidos propios, algunos de los cuales habían sido descritos anteriormente como auto-antígenos (Wahlström et al., 2007). Usando tejido tiroideo de pacientes con Enfermedad de Graves, se pudo identificar un repertorio de 162 péptidos asociados a HLA-DR, que en su mayoría correspondían a proteínas del coloide tiroideo; de éstos, 8 péptidos derivados de la tiroglobulina, un conocido auto-antígeno en esta patología (Muixí et al., 2008).

En AR, la espectrometría de masas ha permitido análisis del proteoma de fluido y tejido sinovial de pacientes con AR, comparándolo con muestras de pacientes con artrosis (OA) (Sinz et al., 2002), permitiendo detectar la presencia en tejido sinovial de auto-antígenos ya descritos, como es el caso de vimentina y fibrinógeno, los cuales se encuentran citrulinados en articulaciones de pacientes con AR (Matéos et al., 2012, Van Steendam et al., 2012, Hermansson et al., 2010). También se ha estudiado complejos inmune para la búsqueda de nuevos auto-antígenos en AR (Monach et al., 2009). Finalmente, se han realizado estudios comparativos entre

individuos fumadores y no fumadores para detectar la presencia de proteínas citrulinadas en pulmón y sus implicancias para AR (Lugli et al., 2015).

Este trabajo estudia el peptidoma asociado a la molécula HLA-DR en alelos que confieren susceptibilidad a AR, tomando por una parte los péptidos obtenidos desde tejido de pacientes AR, que presentaban un curso crónico de la enfermedad, para una visión “in situ” de los procesos biológicos que están siendo favorecidos. Y por otra parte, desde células dendríticas que expresan moléculas MHC pertenecientes al EC y que fueron pulsadas con fluido de paciente AR, para obtener una mejor aproximación de los péptidos que son procesados y presentados en células APC que expresan una cantidad importante de moléculas HLA-DR. A través de estas dos aproximaciones observaremos diferencias y coincidencias en el repertorio, en búsqueda de posibles candidatos a auto-antígenos e información relevante sobre el tipo de unión que caracteriza a estos alelos y presencia de citrulinación.

Como antecedente, ya se ha realizado un estudio comparativo de NPPs desde tejido sinovial de pacientes con AR y enfermedad de Lyme, una artritis infecciosa, identificándose 166 péptidos. Entre estos péptidos no se detectaron modificaciones post-traduccionales, junto con presentar otras limitaciones, como una baja purificación de los complejos HLA-DR/péptido debido a la expresión variable de la molécula HLA-DR en el tejido sinovial, además de un número reducido de donantes de tejido (Seward et al., 2011). Para obtener una mayor purificación de complejos HLA-DR/péptidos, en este proyecto se ha decidido utilizar la estrategia de pulsar células dendríticas con fluido sinovial, semejando la experiencia desarrollada por un grupo holandés que logró identificar secuencias inmunogénicas de Factor VIII en pacientes con hemofilia (Van Haren et al., 2011). La información encontrada será útil

para desarrollar búsqueda de auto-antígeno y posible desarrollo de terapia celular en AR.

HIPÓTESIS

"Las moléculas HLA-DR que expresan el epítipo compartido favorecen la presentación de péptidos de alta afinidad derivados de proteínas presentes en tejido y fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide"

OBJETIVO GENERAL

Identificar péptidos derivados de proteínas de fluido y tejido sinovial de pacientes con AR que son presentados por moléculas HLA-DR positivas para el EC. Determinar el grado de afinidad teórico de estas moléculas a las secuencias peptídicas encontradas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener muestras de tejido y fluido sinovial de pacientes con AR.
2. Generar CDs cargadas con fluido sinovial, a partir de monocitos de donantes sanos positivos para los alelos del EC.
3. Aislar complejos HLA-DR/péptido desde células presentadoras de antígenos residentes en tejido sinovial de pacientes con AR.
4. Aislar complejos HLA-DR/péptido desde CDs de donantes sanos positivos para los alelos del EC pulsadas con fluido sinovial de pacientes con AR.
5. Identificar los péptidos asociados a moléculas HLA-DR tanto de tejido sinovial de pacientes con AR como de CDs pulsadas con fluido sinovial de estos pacientes.
6. Definir, a partir de las secuencias obtenidas, aquellos péptidos que presenten alto grado de afinidad teórica y promiscuidad para moléculas HLA-DR positivas para el EC.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Pacientes AR, Pacientes OA y Donantes Sanos

1.1 Paciente AR

Se reclutaron 16 pacientes diagnosticados con AR, según criterio del colegio Americano de Reumatología (ACR) año 1987 (Arnett et al 1988).

Los pacientes seleccionados fueron sometidos a una entrevista y examen físico para recabar datos clínicos y tener antecedentes del grado de actividad de la enfermedad. Esta entrevista fue realizada por su médico tratante. Se obtuvo material biológico (40 mL de sangre) para determinar los genes HLA-DRB1, HLA-DRB4, HLA-DRB10. A los pacientes AR con indicación de reemplazo articular de rodilla o sinovectomía global, se obtuvo durante cirugía, tejido y fluido sinovial para el estudio de epítopes en AR.

Los pacientes provenían del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y Hospital del Salvador y este trabajo fue desarrollado en colaboración con el Traumatólogo, Dr. Catalán y la reumatóloga, Dra. L. Soto.

Todos los pacientes firmaron consentimiento informado aprobado por el comité de ética de investigación en seres humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Anexo 1.

1.2 Paciente OA

Se reclutaron 11 pacientes diagnosticados con Artrosis primaria, como parte del grupo control. Ellos al igual que los pacientes AR, fueron sometidos a una entrevista para recabar datos clínicos relacionados con su enfermedad, realizada por su médico tratante. Además se obtuvo 5 mL de sangre periférica para determinar los genes HLA-DRB1, HLA-DRB4, HLA-DRB10. A los pacientes OA con indicación de reemplazo articular de rodilla o sinovectomía global, se obtuvo durante cirugía, tejido y fluido sinovial como grupo control.

Los pacientes provenían del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y Hospital del Salvador y este trabajo fue desarrollado en colaboración con el Traumatólogo, Dr. Catalán y la reumatóloga, Dra. L. Soto.

Todos los pacientes firmaron consentimiento informado aprobado por el comité de ética de investigación en seres humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Anexo 1.

1.3 Donante sano

Se reclutaron 100 donantes sanos. Se obtuvo 5 mL de sangre periférica para determinar los genes HLA-DRB1, HLA-DRB4, HLA-DRB10. A aquellos donantes positivos para genes del EC, se le solicitó autorización para utilizar un producto derivado de su donación de sangre, consiste en concentrado de leucocitos o “*Buffy coat*” para la generación de células dendríticas que fueron pulsadas con fluido sinovial.

Todos los donantes sanos firmaron consentimiento informado aprobado por el comité de ética de investigación en seres humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Anexo 1

2. Tejidos

2.1 Transporte de Tejido

Los tejidos obtenidos de artroscopia de rodilla de paciente AR y OA, fueron transportados en hielo a 4 °C, en medio de transporte para muestras biológicas.

2.2 Procesamiento de tejido para espectrometría de masas

El tejido fue cortado en piezas de aproximadamente 1mm³ y sumergido en isopentano enfriado en un baño de acetona y hielo seco. Los bloques obtenidos fueron guardados en crio-tubos a -80°C hasta su procesamiento.

2.3 Procesamiento de tejido para microscopía de epifluorescencia

El tejido de los pacientes AR5 y AR8 y el paciente OA 8 fueron embebidos en Tissue-Tek® *Optimum cutting temperatura (OCT)* Compound (Sakura finetek Inc, Estados Unidos), que es una formulación soluble de glicol y resinas que permiten una matriz de muestra ideal para seccionar mediante a criostato a temperaturas de -10°C y más bajas. Posteriormente, se usó nitrógeno líquido para congelar de

manera inmediata estos tejidos frescos. Los bloques fueron guardados a -80°C . Mediante criostato se realizaron cortes de $8\ \mu\text{m}$ de espesor y puestos en portaobjetos, los cuales previamente fueron limpiados en alcohol. Los portaobjetos fueron guardados a -80°C hasta su uso.

2.4 Fluido sinovial

Las muestras de fluido sinovial de los pacientes AR y OA fueron tratadas con la enzima hialuronidasa, para disminuir el grado de viscosidad. La enzima hialuronidasa (Sigma-Aldrich, St Louis, Estados Unidos), se suspendió en una solución que contenía $0.02\ \text{M}$ Buffer fosfato (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4) a pH 7, $77\ \text{mM}$ NaCl, 0.01% BSA. Todos los fluidos sinoviales fueron incubados con hialuronidasa a una concentración final de $10\ \text{U/ml}$, por 30 minutos a 37°C (Mathsson et al., 2006).

3. Generación de células dendríticas pulsadas con FS de paciente AR, a partir de monocitos de donante sano.

3.1 Genotipificación de donantes sanos

Se utilizó protocolo de Miller modificado para la obtención de DNA genómico. Brevemente, se utilizaron $5\ \text{ml}$ de sangre periférica. En un tubo cónico de $15\ \text{ml}$ se agregaron $5\ \text{ml}$ de Buffer TKM1 (Tris $10\ \text{mM}$, KCl $10\ \text{mM}$, MgCl_2 , ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) $2\ \text{mM}$ a pH 7,6), $125\ \mu\text{l}$ de Triton x-100 y $5\ \text{ml}$ de sangre total. Se centrifugó a $2500\ g$ por $10\ \text{min}$ a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en Buffer TKM1 y se centrifugó nuevamente a $2500\ g$ por $10\ \text{min}$ a

temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en Buffer TKM2 (Tris 10mM, KCl 10mM, MgCl₂, EDTA 2mM, 400mM NaCl a pH 7,6), se agregaron 50 µl de Dodecil sulfato sódico (SDS) al 10% y se mezcló suavemente. Se agregó Proteinasa K (Invitrogen, Estados Unidos) a una concentración 10 µg/µl y se incubó 10 min a 55°C. Posteriormente se agregaron 300 µl de NaCl 6M. Se centrifugó a 3500 g por 15 min a temperatura ambiente, se recolectó el sobrenadante y se agregó etanol al 100% frío y después etanol al 70%. Se centrifugó a 10000 g por 5 min, se eliminó el sobrenadante y posteriormente se resuspendió en 300 µl de Buffer TE (Tris 10mM, EDTA 0,1mM a pH 8,0). La calidad de DNA genómico obtenido fue medida por el equipo Nanodrop (Biotek Instruments Inc. Estados Unidos).

Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el gen HLA-DRB1, con partidores específicos para alelos de los serotipos DR1, DR4 y DR10, con el fin de seleccionar los donantes que posean estos alelos.

El diseño de los partidores fue realizado mediante búsqueda en la base de datos www.ebi.ac.uk (Tabla1). Se preparó una mezcla con dNTP 0,25 mM, partidores 0,5mM, 1U de Paq5000 DNA polimerasa, (Stratagene, Estados Unidos) y 100 ng total de DNA templado, en Buffer de reacción 1x (Stratagene, Estados Unidos).

Se visualizó la amplificación del producto de PCR, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (0,4 gr de agarosa en 40ml de Buffer TBE 1x más bromuro de etidio). Se cargaron 2µl de Buffer de carga y 10 µl de producto de PCR. Se utilizó un marcador de DNA de 100 pb.

Tabla 1. Partidores utilizados en la detección de los genes DR1, DR4, y DR10

Alelo	Pares de bases	Partidor Forward 3'	TM	Partidor Reverse 5'	TM
DR1	194	36F: 5' TTG TGG CAG CTT AÁG TTG AÁT 3'	58° C	39R: 5'CCG CCT CTG CTC CAG GAG 3'	62° C
DR4	259	47F: 5'GTTTCTTGGAGCAGGT TAÁACA3'	58° C	37R: 5'CTGCACTGTGAÁGCTCTC AC3'	58° C
DR10	203	53F: 5'CGGTTGCTGGAÁAGAC GCG3'	58° C	37R: 5'CTGCACTGTGAÁGCTCTC AC3'	58° C

Las muestras que resultaron positivas para los serotipos DR1, DR4 y DR10 se genotipificaron en el Laboratorio Banc de sang i teixits, LIRAD, Barcelona, España, mediante la técnica PCR-SSO. Esta técnica PCR-SSO (oligonucleótidos o sondas específicos de secuencia) consiste en la amplificación mediante PCR de los distintos exones polimórficos de genes HLA (exón 2 en los genes HLA-DR, DQ y DP; y exones 2 y 3 en HLA-A, B y C) y su hibridación posterior con sonda específica (SSOs).

3.2 Purificación de monocitos

A los donantes positivos para los alelos HLA-DRB1* 01:01 y 10:01 se les realizó una leucoféresis para obtener células mononucleares de sangre periférica (PBMC, del inglés *peripheral blood mononuclear cells*). Brevemente, se añadió EDTA a una concentración final de 1mM al producto de la leucoféresis. Posteriormente se adicionó mezcla de anticuerpos para selección de monocitos *RosetteSep® Human Monocyte Enrichment Cocktail* (*StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada*), que contiene una combinación de anticuerpos monoclonales (anti-CD2, CD3, CD8, CD19, CD56, CD66b CD123 y Glicoforina) que forma un complejo de inmuno-rosetas que permite seleccionar de forma negativa a los monocitos mediante gradiente de densidad. Se homogenizó e incubó por 20 min a 37°C. Se diluyó la sangre con Buffer Fosfato Salino estéril (PBS, 2mM NaH₂PO₄, 8Mm Na₂PO₄, 150mM NaCl) más 10 % de suero fetal bovino y *Ficoll-Paque™ Plus* (*GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, Estados Unidos*), en una proporción de un tercio para cada uno y se centrifugó 20 minutos a 1200 g. Se removió la interface rica en células y se lavó dos veces con PBS estéril. El sobrenadante se descartó y se añadió Buffer Amoniacocloruro-Potasio (ACK) para la lisis de glóbulos rojos que contaminaron la suspensión celular y se centrifugó. Posteriormente se realizó recuento celular y se tomó una alícuota para estudios de pureza mediante citometría de flujo.

3.3 Diferenciación de los monocitos a células dendríticas, pulso con FS y maduración de células dendríticas

Basados en el protocolo de Sallusto (Sallusto et al.,1994) y posteriores modificaciones según protocolo de García-González (García-González et al., 2013), los monocitos aislados fueron cultivados en una cantidad de $2,5 \times 10^6$ células por pocillo, en placas de 6 pocillos por 5 días en medio AIM-V libre de suero (GIBCO BLR, Invitrogen, Grand Island, NY, Estados Unidos) en presencia de 500 U/ml de Factor estimulante de colonia de granulocitos-monocitos (GM-CSF) recombinante humano y 500 U/mL de IL-4 (eBioscience, San Diego, CA, Estados Unidos) a 37°C al 5% de CO₂. Al tercer día de cultivo se cambió el medio y se agregó la misma cantidad de citoquinas. Pasado 12 horas del cambio de medio se añadió 200 µg/ml de fluido sinovial previamente tratado con hialuronidasa, dividiendo las CDs en pulsadas y no pulsadas en una proporción similar. Se seleccionaron los fluidos sinoviales de pacientes en donde hubiese una coincidencia el haplotipo del donante y el fluido del paciente (CD 31 y AR12). También aquellos fluidos de pacientes a cuyo tejido sinovial se hubiesen realizado secuenciación por espectrometría de masas (AR7 y AR12). Así de manera indirecta, observar si hubo presentación antigénica del fluido sinovial de parte de las CDs del donante.

En el cuarto día se añadió 1 µg/ml de lipopolisacárido (LPS; Escherichia coli, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) para la obtención de CDs maduras. Al quinto día las células fueron cosechadas dejando una alícuota para estudio de fenotipo y viabilidad. Las células restantes fueron centrifugadas en PBS y el pellet obtenido fue puesto en

crio-tubos para su congelación en nitrógeno líquido para posteriormente obtener los complejos HLA-DR-péptidos.

4. Electroforesis de proteínas

4.1 Gel de poliacrilamida

Se utilizó gel de poliacrilamida en distintas concentraciones, según finalidad del análisis. Para ver la integridad de las proteínas contenidas en fluido sinovial de los pacientes, tejido sinovial de pacientes con AR y OA, se utilizó gel de poliacrilamida al 12-15%.

4.2 Electroforesis

Se realizó electroforesis en condición denaturante en todos los análisis. Las muestras fueron calentadas 5 min a 95°C en presencia de buffer de muestra (62.5mM Tris-HCL pH 6,8, 0.02% azul de bromofenol, 10% de glicerol, 0.1% de SDS y 12,5% β -mercaptoetanol). La electroforesis fue corrida en Buffer de corrida (35mM Tris, 1,32mM glicina y 0,1% de SDS) a 120 voltios.

4.3 Tinción de geles

Se utilizó tinción de Azul de Coosamie (Sigma-Aldrich, St Louis Estados Unidos) (0,5g de Azul de Coosamie, 250mL de metanol y 200mL de agua destilada). Al momento de utilizar se agregó un 10% de ácido acético. Los geles fueron lavados

en agua destilada y luego desteñidos en solución de destinción (20% de metanol) en varias ocasiones.

5. Análisis por Western-Blot

5. 1 Western blot de tejido sinovial de pacientes con AR para evaluar la expresión de HLA-DR

Se utilizó PBMC como control positivo, debido a la alta expresión de la molécula HLA-DR de estas células y la línea celular CHO (Ovario de Hámster Chino) control negativo, ya que estas células no expresan esta molécula. Ambos tipos celulares fueron lavados con PBS pH 7,0 y centrifugados a 1200 rpm por 5min a 4°C. El pellet fue lisado con 1mL Buffer de lisis RIPA (Radio Immunoprecipitation Assay) (50mM Tris, 150mM NaCl, 0,1% SDS, 0,5% deoxicolato de sodio, 1% Triton X100) más inhibidores de proteasa (PMSF, aprotinina, leupeptina, pepstatina). Se agitó en vórtex suavemente y luego se centrifugó por 15 min a 13200 rpm a 4°C. Se recolectó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas mediante método de Bradford

Las muestras de tejido sinovial de paciente con AR y OA obtenidos desde artroscopia siguieron el protocolo de conservación indicado en la sección 2.2. Para realizar el western blot, estos tejidos fueron puestos en hielo a 4°C. Se tomó de cada tejido alrededor de 100 mg. Se homogenizó de manera mecánica en presencia de buffer de homogenización (50mM Tris, 4% de IGEPAL más inhibidores de

proteasas). Se sonicó por 8 segundos en hielo. Posteriormente, se centrifugó por 15 min a 13200 rpm a 4°C y se obtuvo el sobrenadante que se cuantificó utilizando método BCA. Se cargaron 20 µg de proteína del extracto celular de PBMC, línea celular CHO, lisado de tejido AR y lisado de tejido OA en un gel de poliacrilamida. Las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 15%. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa por 60 min a 100 volts. La membrana fue lavada y se incubó en Buffer TBS más 0,1% de Tween 20, 5% de leche descremada), toda la noche a 4 °C. Posteriormente se lavó en Buffer TBS pH 7,5+ 0,1% de Tween 20 y se incubó con anticuerpo primario anti-HLA-DR humano hecho en ratón clon TAL1B5 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), que reconoce al dímero de la cadena α de la molécula HLA-DR, a una dilución de 1:5000 a temperatura ambiente por 2 horas. Se lavó en Buffer TBS pH 7,5 + 0,1% de Tween 20. La membrana fue incubada con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Invitrogen, Estados Unidos) en dilución 1:1000 por dos horas a temperatura ambiente. Para revelar la membrana se utilizó el kit Pierce™ ECL Western Blotting Substrate. (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos)

5.2 Western blot para evaluar la presencia de proteínas citrulinadas en tejido y fluido sinovial de pacientes con AR.

Se realizaron dos aproximaciones de western blot para la detección de proteínas citrulinadas. Ambas utilizaron lisado de células cornificadas de piel de un donante, como control positivo, se utilizó este control debido a la gran cantidad de proteínas citrulinadas encontradas en la piel debido al proceso de cornificación. (Uysal, et al., 2010). Para este lisado se utilizó el siguiente Buffer de lisis: 62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 5% β -mercaptoetanol y 10% de glicerol.

En la primera aproximación se utilizó además lisado de bacterias *E. coli* como control negativo, debido a que no se observa citrulinación en esta línea. Para las muestras de tejido sinovial de pacientes con AR8 y OA8, se siguió el protocolo de lisis descrito en la sección (5.1). Se cargaron 30 μ g de proteína del lisado bacteriano, 10 μ g de proteína del lisado de células cornificadas y 50 μ g de proteínas de las muestras de tejido o fluido sinovial (éste último de pacientes con AR). Las muestras fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12%. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa por 60 min a 100 voltios. La membrana fue lavada y se incubó en Buffer TBS más 0,1% de Tween 20 y 5% albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, St Louis, Estados Unidos), por 2 horas en agitación constante. Posteriormente se lavó en Buffer TBS pH 7,5 más 0,1% de Tween 20. Y se incubó con anticuerpo policlonal de conejo anti-citrulina (LS-C 145131, LifeSpan Biosciences Inc, Seattle, Estados Unidos) en una dilución de 1:500 toda la noche a 4°C, en agitación. Este anticuerpo reacciona

específicamente con citrulina intra-péptidos independiente de la secuencia. Se lavó en Buffer TBS pH 7,5+ 0,1% de Tween 20. La membrana fue incubada con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo hecho en cabra, conjugado con HRP (Dako, Dinamarca) en dilución 1:2000 por dos horas a temperatura ambiente. Para revelar la membrana se utilizó kit Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos)

La segunda aproximación utilizó la línea celular CHO como control negativo. La diferencia con el primer método fue un paso de modificación química antes de incubar con el anticuerpo primario, en el que una solución ácido fuerte y los compuestos 2,3 butanediona monoxima y antipirina permiten la formación de un grupo ureido aductor con los residuos de citrulina. Se utilizó como anticuerpo primario un anticitrulina policlonal hecho en conejo que reconoce la citrulina modificada (Millipore, Temecula, CA, Estados Unidos) en una dilución 1:1000 toda la noche a 4°C. Los siguientes pasos del protocolo fueron iguales al primer método empleado, al inicio de esta sección (5.2).

6. Detección de anticuerpos anti-vimentina mutada citrulinada (MCV) en fluido sinovial de pacientes AR

Se usó el kit comercial Anti-MCV® (Orgentec, Diagnostika, Mainz-Hechtsheim, Alemania), para la determinación de anticuerpos IgG anti- Vimentina citrulinada mutada (MCV) en muestras de fluido sinovial de los siguientes pacientes: AR1, AR2, AR3, AR5, AR6, AR7, AR8, OA1, OA3, OA6 y OA11. Se tomó 10µl de fluido como

volumen de muestras, según fabricante los valores superiores a 20 U/ml son considerados positivos.

7. Microscopía de Epifluorescencia

7. 1. Evaluación de la expresión de la molécula HLA-DR en tejido sinovial de pacientes con AR y OA.

Los portaobjetos con las muestras se dejaron a temperatura ambiente por 30 min. Luego fueron fijados en acetona por 10 min a -20°C. Se utilizó un “wax pen” o lápiz de cera, para dibujar un círculo hidrofóbico alrededor del tejido, para prevenir la contaminación. Este lápiz es insoluble en etanol, acetona y agua. (Sigma-Aldrich, St Louis Estados Unidos). Posteriormente, se lavó con Buffer PBS pH 7,0 y se bloqueó las muestras con Buffer PBS pH 7,0 con 5% de BSA por 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se utilizó anticuerpo anti-HLA-DR-FITC (eBiosciences, Estados Unidos) en una dilución 1:100 y se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente. Se lavó, se removió el exceso y se añadió la tinción de contraste 4',6-diamidino-2-phenilindol (DAPI) ((Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) por 5 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron deshidratados en etanol al 100% y se montó con glicerol. Las muestras fueron visualizadas en el microscopio de epifluorescencia LSM 510 (Carl Zeiss, Germany). El análisis de las imágenes se realizó con el programa Image J (National Institutes of Health, Estados Unidos).

7.2 Evaluación de la presencia de proteínas citrulinadas en tejido sinovial de pacientes con AR y OA

Para evaluar la presencia de proteínas citrulinadas en tejido sinovial se utilizó protocolo de Chang (Chang et al., 2009). Previo a la incubación con el anticuerpo primario, se realizó un paso de modificación de citrulinación como fue descrito en este protocolo. Se utilizó como control negativo de la técnica, el tejido sinovial de AR sin modificación. Brevemente, los portaobjetos fueron puestos a temperatura ambiente por 30 min. Luego fueron fijados en acetona por 10 min a -20°C . Posteriormente, se lavó con Buffer PBS pH 7,0. Los cortes fueron tratados con solución modificante (0,5% 2,3 butanedione, 0,25% antipirina, 0,5 ácido acético, 0,025% FeCl_3 , 4,6M H_2SO_4 , 3M H_3PO_4). Después de sucesivos lavados con PBS pH 7, se bloquearon las muestras con Buffer PBS pH 7,0 con 5% de BSA por 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo de conejo anti-citrulina modificada (Millipore, Temecula, CA, Estados Unidos) en una dilución 1:125 toda la noche a 4°C . Luego se incubó con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo hecho en cabra, conjugado con Alexa 488 (Abcam, Reino Unido), en una dilución 1:200 en PBS y al 5% de BSA por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se removió el exceso y se añadió la tinción de contraste DAPI por 5 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron deshidratados en etanol al 100% y se montó con glicerol. Las muestras fueron visualizadas en el microscopio confocal LSM 510 (Carl Zeiss, Germany). El análisis de las imágenes se realizó con el programa Image J (National Institutes of Health, Estados Unidos).

8. Citometría de Flujo

8. 1 Evaluación de pureza de monocitos

De los donantes sanos DC 10, DC16 y DC31 se obtuvo producto centrado de leucocitos "*Buffy coat*", mediante utilización de rosetas que contenían los anticuerpos; anti-CD2, CD3, CD8, CD19, CD56, CD66b CD123 y Glicoforina, se selección de manera negativa los monocitos, mediante gradiente de densidad. La pureza de los monocitos aislados, fue medida el día 0 de la diferenciación a célula dendrítica. Se plaquearon en placas fondo V 1×10^5 células por pocillo, se centrifugó a 2000 rpm a 4°C y se suspendió en PBS 10% de SFB. Se incubó con los anticuerpos anti-CD14 FITC, CD11c APC (eBiosciences, Estados Unidos) y control de isotipo (IgG1 FITC, IgG1 APC) (eBiosciences, Estados Unidos), por 30 minutos a 4°C. Se lavó en Buffer PBS 3% de SFB y se agregó Buffer de fijación *IC Fixation Buffer* (eBioscience, Estados Unidos) a cada pocillo. Los datos fueron recolectados en el citómetro FACSCalibur (Beckton Dickinson, San Diego, CA, Estados Unidos) por el programa CellQuest PRO y los análisis se realizaron mediante los programas WinMDI 2.9 y Flowjo (Estados Unidos)

8.2 Evaluación del fenotipo de las células dendríticas generadas

La diferenciación de monocito hacia célula dendrítica fue evaluada al día 5 del protocolo. Se plaquearon 2×10^5 células por pocillo en placas fondo V. Se centrifugó a 2000 rpm a 4°C y se resuspendió en PBS 10% de SFB. Se incubó con los anticuerpos anti-CD83 FITC, HLA-DR FITC, CD86 PE, CD40 PE, CD11c APC (eBiosciences, Estados Unidos) y control de isotipo (IgG1FITC, IgG2b FITC, IgG2b PE, IgG1 APC) (eBiosciences, Estados Unidos), por 30 minutos a 4°C. Se lavó en Buffer PBS 3% de SFB y se agregó Buffer de fijación *IC Fixation Buffer* (eBioscience, Estados Unidos) a cada pocillo. Los datos fueron recolectados en el citómetro FACSCalibur (Beckton Dickinson, San Diego, CA, Estados Unidos) por el programa CellQuest PRO y los análisis se realizaron mediante los programas WinMDI 2.9 y Flowjo (Estados Unidos).

8.3 Estudio de muerte celular

Se evaluó el grado de muerte celular de las células dendríticas en cultivo mediante la unión de los marcadores Anexina V y 7-AAD. Brevemente, se plaquearon 1×10^5 células por pocillo en placas con fondo en V, y fueron resuspendidas en Buffer de unión 1x y Anexina V PE (eBiosciences Estados Unidos). Se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas en buffer de unión y resuspendidas en este mismo Buffer. Se agregó el marcador 7-Aminoactinomicina (AAD) (eBiosciences, Estados Unidos) y se dejó a 4°C. Se realizó

análisis antes de 4 horas pasada la marcación. Los datos fueron recolectados en citómetro FACSCalibur (Beckton Dickinson, San Diego, CA, Estados Unidos) por el programa CellQuest PRO y los análisis se realizaron mediante los programas WinMDI 2.9 y Flowjo (Estados Unidos).

9. Obtención de péptidos asociados a moléculas HLA-DR

9.1 Preparación de la columna de sefarosa

Se preparó una columna con esfera de sefarosa activada CnBR-*activadas* 4B (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) con el anticuerpo anti-HLA-DR L243 purificado para obtener una columna de 2 g/ml de anticuerpo en 1 ml de volumen final. Brevemente, las perlas de sefarosa fueron pesadas y resuspendidas en 1mM de HCl. Las perlas hidratadas fueron lavadas en 1Mm HCl y Buffer de unión (0,1M NaHCO, 0,5M NaCl, pH 8,3), y se centrifugó a 500g por 2 min a temperatura ambiente. Las perlas fueron incubadas con la solución de anticuerpo por 4 horas a temperatura ambiente. Como control de unión, se realizó mediciones de absorbancia a 280 nm. Se lavó tres veces en Buffer de bloqueo (0,1M Tris-HCl pH 8,0) y se incubó con este mismo buffer por 2 horas a temperatura ambiente en rotación. Las perlas fueron lavadas de manera alternada con buffer de lavado pH 4,0 (0,1M NaAc, 0,5 NaCl) y 30 mL de buffer de lavado pH 8,0 (0,1M Tris-HCl, 0,5M NaCl) tres veces. La columna de sefarosa-anticuerpo fue guardada a 4°C en 0,02% de azida de sodio en Buffer de lavado pH 8,0.

9. 2 Purificación de péptidos unidos a molécula HLA-DR de tejido sinovial y células dendríticas cargadas con fluido sinovial

9.2.1 Purificación de péptidos asociados a HLA-DR desde extractos de tejido sinovial de pacientes AR

El tejido sinovial fresco fue cortado en trozos de 1 cm³ y congelado en isopentano frío. Los bloques fueron guardados en nitrógeno líquido antes de su utilización. Para la purificación de complejos péptidos/HLA-DR, el tejido se homogenizó mecánicamente con Buffer de homogenización de tejido (50mM Tris-HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, más inhibidores de proteasas (Roche, Alemania). Posteriormente el homogenizado obtenido, fue resuspendido en Buffer de homogenización más 3-3 colamidopropildimetilamonio 1-propanosulfato (CHAPS) al 1% y se agitó por una hora en hielo. Se centrifugó a 2500 rpm por 15 min a 4°C y el sobrenadante se centrifugó a 30000 rpm por 1 hora a 4°C. Se retiró la fase intermedia, libre de lípidos y transfirió a un tubo cónico. Se agregaron perlas de sefarosa pre-acondicionadas con Buffer de lavado (50mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl) y se incubó por 3 horas en rotación a 4°C. Se decantó por gravedad y se recolectó “*pass-through*”. Se tomó el “*pass-through*” y se mezcló con la sefarosa+anticuerpo L243 (aprox 2 mg/mL), en agitación por 3 horas a 4°C. Se empaquetó en columna de 10 mL desechable y se dejó decantar. Se recogió el *pass-through* y se lavó la columna con Buffer de lisis sin inhibidores de proteasas. Se lavó varias veces con Buffer de lavado. Se eluyó lo retenido en la columna con sefarosa

no acoplada (pre-columna) y lo retenido en sefarosa-anticuerpo con Buffer de elusión (0,1% ácido trifluoroacético).

Posteriormente, se separó por tamaño las cadenas de HLA-DR y los péptidos utilizando tubos centricon (Millipore, filtro 10000 MWCO, Estados Unidos). Para ello se cargaron las fracciones eluidas, se centrifugó a 3600 rpm, se recuperó lo que pasó a través de membrana, se llevó a desecación mediante speedvac y se resuspendió con agua destilada para la espectrometría de masas. Como control se realizó una electroforesis en gel de SDS/PAGE al 12% para visualizar las cadenas alfa y beta de la molécula HLA-DR retenidas en la membrana, cuyo peso molecular es de 33 KDa y 28 KDa respectivamente.

9.2.2 Purificación de péptidos desde células dendríticas cargadas con fluido sinovial

Los complejos HLA-DR-péptidos fueron purificados según protocolo de van Haren (van Haren et al., 2011). El pellet de células dendríticas fue resuspendido en Buffer de lisis (50mM Tris-HCl pH 7,0, 4% de NP-40) conteniendo cocktail de inhibidores de proteasas (Halt Protease and Phosphatase Inhibitor cocktail, EDTA free, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) y se incubó una hora a 4°C en agitación. Posteriormente, se centrifugó 14000 rpm por 15 min a 4°C. Los complejos fueron purificados desde la fracción soluble por cromatografía de inmunoafinidad usando sefarosa unida a anticuerpo L243, descrita en la sección **9.2.1**. Se incubó la mezcla de sobrenadante con sefarosa a 4°C toda la noche. La columna de sefarosa fue lavada 3 veces con 10mM de Tris-HCl a pH 7,0 más

inhibidores de proteasas y 5 veces con 10mM de Tris-HCl pH 7,0 sin inhibidores de proteasas. Los complejos fueron eluidos añadiendo solución de 0,1% ácido trifluoroacético. Al igual como en tejido, se realizó control para uniones no específicas, realizándose una cromatografía de aquellas proteínas unidas a la seferosa no acoplada a anticuerpo. La separación de los péptidos y las moléculas HLA-DR se realizó como se describió en la sección anterior. 9.2.2

10. Espectrometría de masas

10.1 Cromatografía en fase líquida- espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS)

El desarrollo de esta etapa fue realizado mediante un proceso de colaboración con el Laboratorio de Proteómica CSIC/UAB de la Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Los péptidos fueron desalados y luego separados y limpiados de detergente a través de una cromatografía de intercambio iónico, usando una columna de polisulfoetil A (50x1mm, 5µm, 200Å). Se cargó un volumen de 200 µl de cada muestra y la separación fue hecha a 50 µl /min. Las fracciones colectadas (6 por muestra) fueron llevadas a desecación reconstituidas en 40 µl de solución al de metanol al 5%.

Se utilizó el espectrómetro de masas LTQ XL Orbitrap (ThermoFisher, Estados Unidos) equipado con fuente de iones nanoESI. Los 40 µl de cada muestra fueron

cargados dentro del sistema cromatográfico, que consiste en una columna C18 (Agilent Technologies). La separación fue hecha a 0,4 $\mu\text{L}/\text{min}$ en una gradiente de acetonitrilo de 3 a 40%. El LTQ XL Orbitrap fue operado en modo ion positivo con un voltaje de 1,8 kV. El análisis espectrométrico fue realizado en modo dependiente, realizándose un scanner global seguido por 10 MS/MS de las 10 señales más intensas detectadas por el espectrómetro de masas. El espectro del MS/MS fue realizado en un analizador de trampa lineal de iones

10.2 Identificación de espectros en base de datos

Los espectros obtenidos fueron identificados utilizando el software SEQUEST (Proteome Discoverer v1.4, ThermoFisher, Estados Unidos) siguiendo estos parámetros: Tolerancia péptido masa 10ppm, tolerancia de fragmento 0,6 Da, sin corte por enzimas y pérdida de más de 2 clivajes, modificaciones dinámicas de la oxidación de la metionina y citrulinación de arginina. En la base de datos se usó el término *“human without isoforms”*. Se utilizó una tasa de falsos descubrimientos (FDR) del 0,1%.

11. Asignación de Afinidad Teórica

Para predecir la afinidad de unión de cada péptido a las moléculas HLA-DR se utilizó 3 diferentes métodos: NetMHCIIpan 2.1 (www.cbs.dtu.dk/services/netmhciipan), Propred (www.intech.res.in/raghva/propred/index.html) y el análisis manual basado en el motivo HLA-DRB1 de SYPEITHY (www.syfpeithy.de).

El programa NetMHCIIpan 2.1 utiliza la red ANN (del inglés *Artificial Neural Network*). Este programa permite predecir de manera eficaz la afinidad por aquellos alelos cuyo motivo de unión no están caracterizados, tomando en cuenta tanto las secuencias de los bolsillos de la moléculas MHC como también el “core” del péptido y las secuencias que lo flanquean (Lundeegarrd et al., 2011). Con este sistema, los péptidos de alta afinidad (AA) corresponden a aquellos que poseen una concentración inhibitoria media (IC_{50}) menor de 50, los péptidos de afinidad intermedia (AI) corresponden a aquellos con un IC_{50} entre 50-500 y los péptidos de afinidad baja (AB) corresponden a aquellos con un IC_{50} mayor a 500.

El programa Propred (Singh et al., 2001) se fundamenta en las base de datos de matrices de unión descritas por Sturniolo (Sturniolo et al., 1999). Aquí se describen motivos de unión para 51 alelos HLA-DR y se asigna una secuencia “core” para el péptido basada en la presencia de al menos un residuo P_1 correcto. Es así que dependiendo de los motivos de unión se fijará un umbral o “*threshold*” bajo o alto en función de la presencia de otros motivos de anclaje (generalmente P_4 , P_6 y P_9). El umbral se fija de acuerdo al percentil de “péptidos naturales”, determinados experimentalmente, que se unen con más afinidad a un alelo en particular. Nosotros utilizamos el siguiente criterio: el péptido fue considerado AA si el core del péptido se encontraba en un umbral = 3. Si el core del péptido tenía un umbral entre 3 y 9, era considerado un péptido AI, y sobre un umbral de 9, era considerado un péptido AB.

Utilizamos como control de análisis el programa basado en motivos de unión SYFPEITHY (Rammensee et al., 1999). A cada secuencia peptídica se le asignó su “core”, lo que se realizó por el programa TEPITOPE ([http://datamining-iip.fudan.edu.cn/service/TEPITOPEpan/TEPITOPEpan.html](http://datamining.iip.fudan.edu.cn/service/TEPITOPEpan/TEPITOPEpan.html)). Se le asignó el residuo

P₁ para cada alelo al aminoácido (aá) en posición 1 del “core”. Posteriormente, se asignó un puntaje dependiendo de las coincidencias con el motivo alélico en los residuos P₄, P₆ y P₉. Un puntaje mayor o igual a 3, que equivale a tres o más coincidencias, era considerado un péptido AÁ, un puntaje de 2 era considerado un péptidos AI, y un puntaje de 1, un péptido AB. Las secuencias donde no coincidía P₁ eran consideradas AB.

Según estos tres programas, a los dos alelos de cada muestra se asignó el tipo de unión, considerando dos ó más coincidencias. En los casos en que no hubo coincidencia entre los programas, se calificó el tipo de unión como Inderterminado (ID). Para asignar el alelo por el cual teóricamente fue presentada la secuencia peptídica, se comparó el tipo de afinidad entre ambos alelos. Si ambos presentaban el mismo tipo de unión, fue anotado como doble unión, compartiendo la asignación. En el caso que el tipo de unión para un alelo era AA y para el otro AI ó AB, se asignó la secuencia peptídica al alelo que presentó mayor afinidad. No se asignó alelo en los casos ID.

En el caso del peptidoma derivado de las células dendríticas del donante CS16, se utilizó una cuarta herramienta bioinformática, debido a que ninguno de sus alelos está contemplado en el programa Propred. El programa IEDB analyses resource (<http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhcIIbinding.html>) (Wang et al., 2010), se basa en el uso de varios métodos de predicción, combinando Consensus, alineación NN, alineación SMM y CombLib y si el motivo HLA no está disponible, usa por defecto NetMHCIIpan. El uso de los métodos de predicción en orden de predilección es Consensus > NetMHCIIpan > NN-align > SMM-align > CombLib.

Se utilizó el programa bioinformático DAVID (Huang et. Al, 2009), para sistematizar e integrar nuestro listado de proteínas a través de la función para agrupar, “*Functional Annotation Clustering*”, entregándonos información sobre que procesos biológicos que son favorecidos desde un grupo de genes relacionando todos los genes de un mismo organismo. Esto fue aplicado en todas la proteínas encontrados en las muestras de tejido y CD. El grado de enriquecimiento fue medido por un puntaje que relaciona todos los puntajes de enriquecimiento para el grupo basados en el puntaje EASE (puntaje basado en el test de Fisher) de cada miembro. Además, se utilizó la base de datos de proteínas Uniprot (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) para clasificar las proteínas según su origen celular

RESULTADOS

1. Péptidos asociados a HLA-DR en tejido sinovial de pacientes con AR que expresan alelos pertenecientes al EC.

1.1 Pacientes AR

Se realizaron los análisis en 3 pacientes mujeres diagnosticadas con AR. El puntaje DAS, nos indica el grado de actividad basado en parámetros clínicos, de laboratorio y condición global del paciente. Al momento de la evaluación por un reumatólogo, los pacientes presentaban una enfermedad activa en el caso del paciente AR12 (puntaje DAS 28 = 8,51), o de actividad intermedia, en el caso de la paciente AR7 (puntaje DAS 28 = 4,51). En el caso de la paciente AR16, no se pudieron obtener los datos referentes al grado de actividad de su enfermedad.. Las pacientes seleccionadas estaban sometidas a tratamiento con drogas anti-reumáticas que modifican la enfermedad (DMARDs, del inglés disease-modifying anti-rheumatic drugs). Al momento de obtener la muestra de tejido, presentaban una evolución de la enfermedad aproximada de entre 20 a 30 años. La edad de las pacientes se encuentra en un rango entre los 50 a 64 años. (Tabla 2). Esta información fue muy relevante ya que las muestras de tejido nos entregaron una visión “in situ” del momento de la enfermedad, que en el caso de estas pacientes presentaban una evolución crónica con un grado activo.

Tabla 2. Características de las pacientes AR que fueron secuenciados por espectrometría de masas.

Muestras de tejido sinovial			
Muestras	AR12	AR7	AR16
Haplotipo	DRB1*01:01 DRB1* 07:01	DRB1*04:01 DRB1*04:07	DRB1*03:01 DRB1*14:01
Sexo	Femenino	Femenino	Femenino
Edad	54	63	60
Años de evolución de la enfermedad	20	21	30
DAS 28	8,51	4, 51	*

*No se pudo obtener desde ficha clínica.

En el caso del paciente AR8 utilizado en el Western blot para medir la expresión de la molécula HLA-DR y proteínas citrulinadas, Este paciente presentaba una enfermedad de larga evolución. El paciente AR5 utilizado en la microscopía de epifluorescencia de proteínas citrulinadas, presentaba un diagnostico reciente, lo que puede relacionarse con el nivel alto de AAPC en fluido sinovial (Tabla 3, Tabla 11)

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes AR

Características clínicas de los pacientes AR						
Muestras	AR1	AR2	AR3	AR4	AR5	AR6
Haplotipo		DRB1*01:02, 04:07	DRB1*08:02, 13:03			
Sexo	Femenino	Femenino	Femenino	Femenino	Femenino	Masculino
Edad	46	43	40	49	46	22
Años de evolución de la enfermedad	4	25	10	5	Recién diagnosticada	1
DAS28		6,03				
Tratamiento	Metotrexato	Metotrexato	Metotrexato	Prednisona	Sin tto	Metotrexato
	Prednisona	Celebra	Prednisona	Celebra		Prednisona
	Leflunomida		Ketoprofeno			

Características clínicas de los pacientes AR							
Muestras	AR7	AR8	AR 9	AR10	AR12	AR15	AR16
Haplotipo	DRB1*04:01, 04:07				DRB1*01:01, 07:01		DRB1*03:01 14:01
Sexo	Femenino	Femenino	Femenino	Masculino	Femenino	Femenino	Femenino
Edad	63	41	41	51	54	39	60
Años de evolución de la enfermedad	21	23	11	29	20	36	30
DAS28	4, 51			5,53	8,51		
Tratamiento	Metotrexato	Celebra	Metotrexato	Plaquinol	Metotrexato	Sin tto	
	Prednisona	Prednisona	Prednisona	Metotrexato	Lertus		
	Paracetamol	Tramal	Ketoprofeno	Prednisona	Tramal		
		Azatioprina		Celebra			

1.2 Expresión de molécula HLA-DR en tejido sinovial

Como estudio previo para análisis de peptidoma asociado a la molécula HLA-DR, se estudió la expresión de la molécula HLA-DR en tejido sinovial tanto de pacientes con AR como de OA. Se utilizaron dos aproximaciones diferentes debido al distinto grado de sensibilidad de cada una de ellas.

En western blot, se observó la presencia de la molécula HLA-DR en tejido sinovial de pacientes AR y en el control positivo (PBMC), pero ausente en el tejido OA (Figura 1). Este hallazgo se correlaciona con la fisiopatología de la AR, en donde se desarrolla un proceso inflamatorio mediado por una respuesta inmune con alta infiltración de leucocitos.

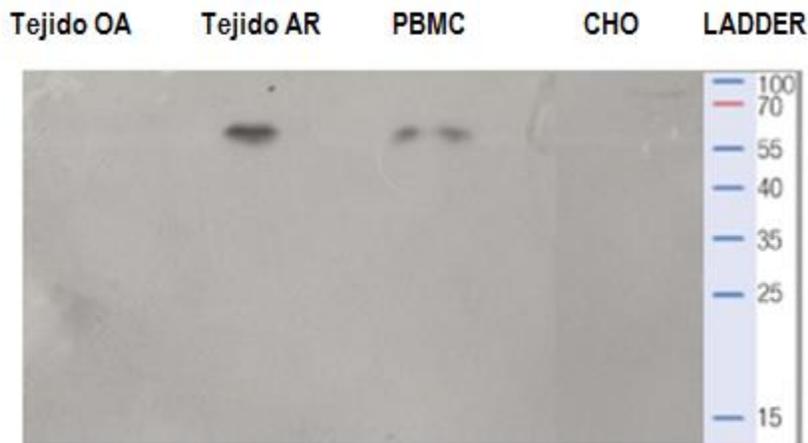


Figura 1. Western blot para evaluar la expresión de la molécula HLA-DR en tejido sinovial de pacientes con AR. Las muestras, tanto de tejido sinovial de paciente con artritis reumatoide (AR) como de paciente con artrosis (OA), fueron homogenizadas y sonicadas. Como control positivo se utilizó PBMC y como control negativo se utilizó la línea celular CHO. La membrana fue incubada con un anticuerpo monoclonal contra las cadenas alfa de la molécula HLA-DR, clon TAL1B5.

Para tener una mejor visión de la arquitectura del tejido y ver la distribución de la molécula HLA-DR, se realizó una microscopía de epifluorescencia del tejido sinovial de un paciente AR y de un paciente OA, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR. Se utilizó la tinción nuclear DAPI para poder discriminar mejor entre el componente celular dentro del tejido, debido a que este presentaba un componente graso y conectivo que dificultaba su observación (Figura 2).

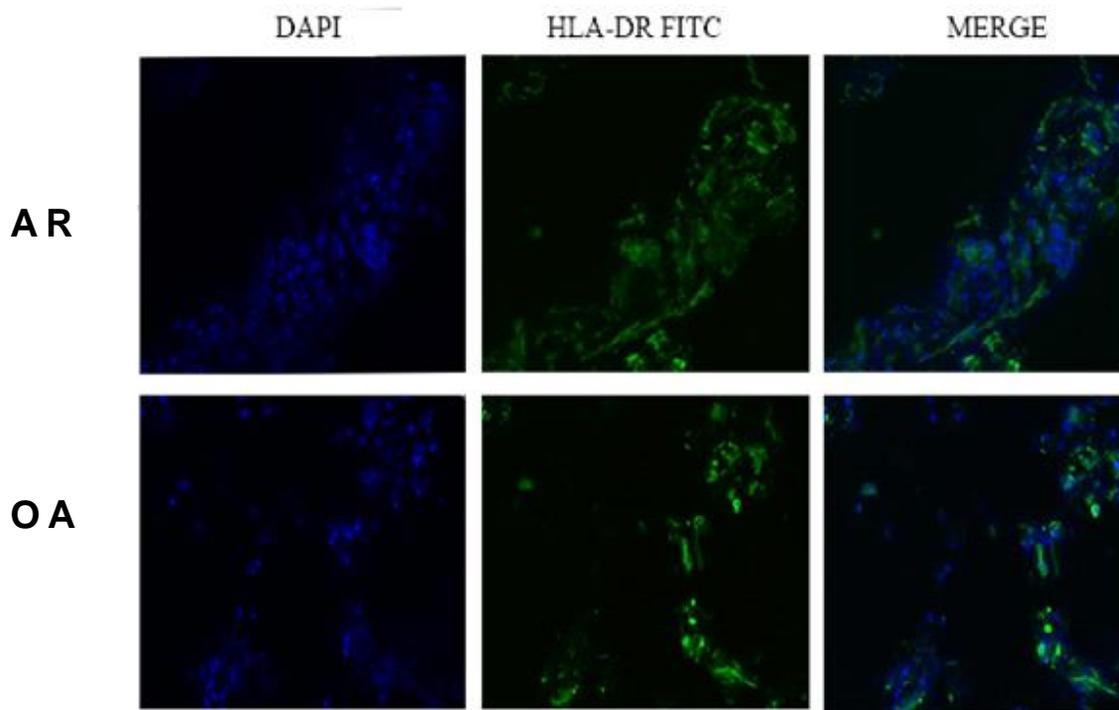


Figura 2. Microscopía epifluorescencia para evaluar la expresión de moléculas HLA-DR en tejido sinovial de pacientes AR y pacientes OA. Se estudió la expresión de la molécula HLA-DR utilizando un anticuerpo anti-HLA-DR conjugado a FITC. En la columna izquierda se observa la tinción nuclear DAPI, en la columna del medio la expresión de la molécula HLA-DR y en la columna derecha podemos observar la sobre posición de ambas tinciones, observándose que las moléculas HLA-DR se expresan en el parénquima de las dos muestras evaluadas.

En la figura 2, se observa la expresión de la molécula HLA-DR en ambos tejidos sinoviales, AR y OA. Al co-localizar, se observa que esta expresión proviene de membrana, ya que está rodeando al núcleo. La arquitectura es irregular en ambos tejidos, pero se logra ubicar zonas en donde hay un componente celular. Cabe señalar que son muestras de tejido sinovial obtenidas desde artroscopia para reemplazo articular, y al momento de procesar estos tejidos se observaba un alto grado de tejido fibroso y graso. La expresión de la molécula HLA-DR en tejido de paciente AR corrobora los resultados mostrados en la figura 1. En el caso del paciente OA8, la expresión de la molécula HLA-DR puede deberse a que los pacientes OA presentan un grado inflamación bajo en el curso de la artrosis primaria (Liao, et al 2013).

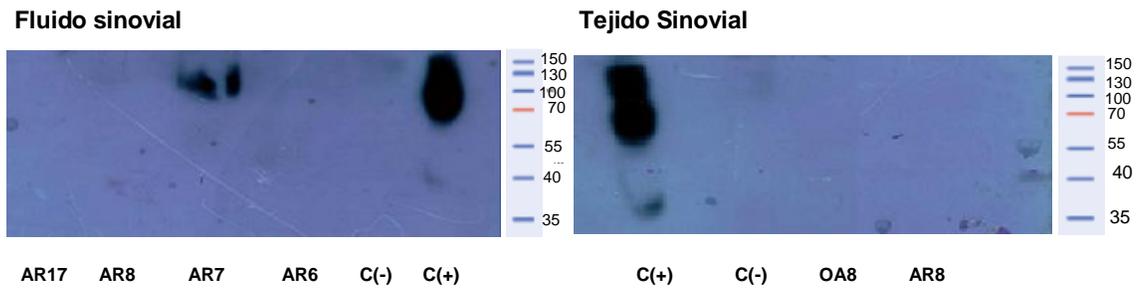
1.3 Presencia de proteínas citrulinadas en tejido sinovial AR

La presencia de AAPC en pacientes con AR es un hallazgo muy usual. A su vez, la citrulinación es una MPT característica de esta patología, así como de otros procesos inflamatorios, pudiendo estar relacionada con la patogénesis de la enfermedad. Quisimos detectar la presencia de proteínas citrulinadas en tejido sinovial de pacientes con AR. Para ello, tomamos dos aproximaciones, las que fueron realizadas mediante western blot. En un caso, la membrana de nitrocelulosa fue previamente expuesta a un buffer de modificación, en donde 2,3 butanediona y antipirina modifican los residuos citrulinados en un medio ácido para formar un compuesto ureido y se utiliza como anticuerpo primario un anticuerpo policlonal anti-citrulina modificada. La segunda aproximación consiste en un western blot sin

modificación de la membrana, utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo policlonal anti-peptidilcitrulina (Figura 3)

Se observó la presencia de proteínas citrulinadas en el fluido sinovial del paciente AR7 en western blot de la membrana sin modificación. En cambio, no se observó la presencia de proteínas citrulinadas en el tejido del paciente AR8, tanto en el western blot sin modificación, como en aquel con modificación, ni tampoco en el fluido sinovial de este paciente. En el control positivo, obtenido desde la capa cornificada de piel, se observaron varias bandas, ya que en este tejido existe gran cantidad de proteínas citrulinadas, como por ejemplo, queratina (Figura 3) (Gyorgy et al., 2006). Cabe señalar, que en el paciente AR8 tampoco se observan altos títulos de AAPC (Tabla 11), lo que puede relacionarse con este resultado. En el tejido sinovial del paciente OA, no se observan proteínas citrulinadas.

A. WB sin modificación



B. WB con modificación

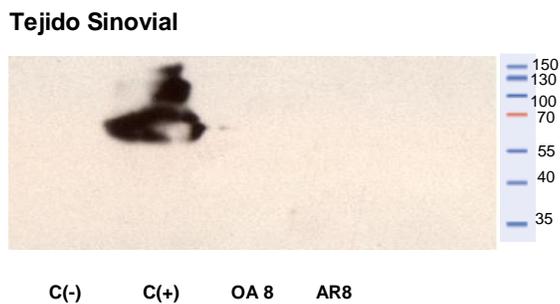


Figura 3. Presencia de proteínas citrulinadas en tejido y fluido sinovial de pacientes AR y OA. A. Western blot sin tratamiento de modificación de residuos citrulinados. Se utilizó como muestras de fluido sinovial los pacientes AR17, AR8, AR7 y AR6, en tanto tejido, se utilizó muestra del paciente AR8 y paciente OA 8. Como control positivo, se utilizó lisado de células cornificadas de piel y como control negativo, lisado bacteriano. Como anticuerpo primario, se usó un anticuerpo policlonal anti-citrulina. **B.** Western blot de una membrana expuesta a modificación mediante 2,3 butanediona y antipirina. Se utilizó muestra de tejido sinovial de paciente AR8 y paciente OA8. Como control positivo, se utilizó lisado de células cornificadas de piel y como control negativo, lisado de línea CHO. Como anticuerpo de detección se usó un anticuerpo anti-citrulina modificada.

Utilizamos microscopía de epifluorescencia como segunda técnica de análisis para la determinación de proteínas citrulinadas en tejido sinovial. Para ello, nos basamos en el trabajo de Chang et al., 2009. Utilizamos tejido sinovial del paciente AR5, que presentaba un alto nivel de AAPC en el fluido sinovial (Tabla 11) y el tejido del paciente OA8. Antes de incubar el anticuerpo primario, sometimos a los cortes a un proceso de modificación con los agentes modificadores 2,3 butanediona y antipirina en un medio ácido. Posteriormente utilizamos como anticuerpo primario un anticuerpo anti-citrulina modificada policlonal y como anticuerpo secundario un anti-IgG de conejo conjugado con Alexa 488. Como control se utilizó muestra de tejido del paciente AR5 sin modificación (Figura 4).

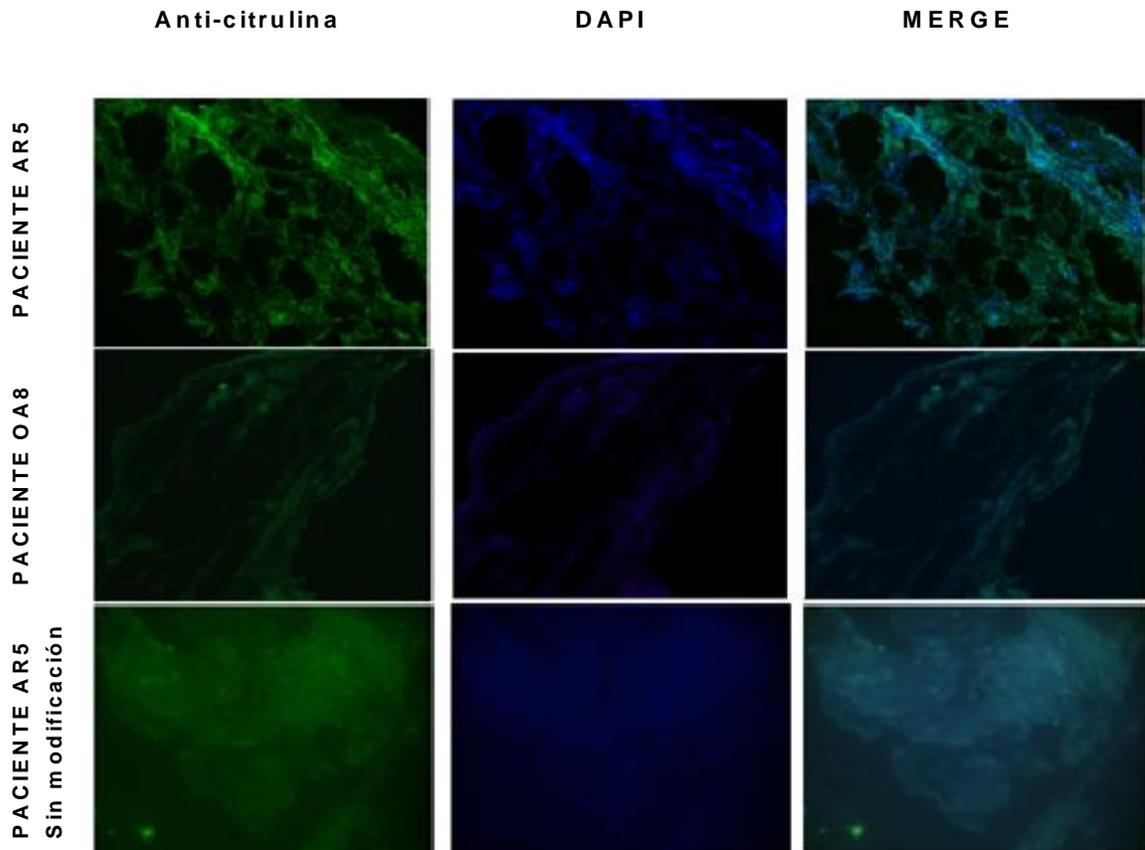


Figura 4. Evaluación de la presencia de proteínas citrulinadas en tejido sinovial de pacientes AR y OA mediante microscopía epifluorescencia.. Microscopía epifluorescencia de las muestras de tejido sinovial de paciente (AR5) y paciente (OA8) que fueron incubadas con anticuerpo que reconoce residuos citrulinados previo tratamiento de modificación química. En la columna izquierda, tinción con el anticuerpo primario anti-citrulina y anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a Alexa 488. En la columna del medio, tinción con DAPI en ambos tejidos. En la columna derecha, co-localización de ambas tinciones.

En la figura 4, se observa la presencia de proteínas citrulinadas en el tejido sinovial del paciente AR5. En cambio, en el paciente OA no se observan péptidos o proteínas citrulinadas, esto se debe a la patogenia de la OA, lo que concuerda con la literatura.

1.4 Descripción de los péptidos asociados a moléculas HLA-DR en tejido sinovial de pacientes AR

Para el análisis del repertorio peptídico asociado a moléculas HLA-DR en tejido sinovial de pacientes con AR, se utilizó tejido proveniente de 3 pacientes de sexo femenino, dos de ellas (AR 7 y AR12) presentaban alelos pertenecientes al EC (Tabla 5).

El análisis fue hecho utilizando el espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap. Los péptidos que aparecieron en las fracciones de la pre-columna fueron eliminados de todas las muestras, al igual que los péptidos derivados de proteínas específicas de la piel, como queratina, considerada contaminante. El listado completo de péptidos que superaron estos filtros se encuentra en Anexo 2. De las 3 muestras analizadas se obtuvieron 141 péptidos, de un total de 30 proteínas. Del paciente AR12 se obtuvieron 36 péptidos de 12 proteínas, del paciente AR7 18 péptidos de 9 proteínas y del paciente AR16 87 péptidos de 9 proteínas. Sobre un 75% de los péptidos presentados lo hicieron en familia de secuencias o “*nested sets*” que significa, un grupo de péptidos con una secuencia central común o “core” y variantes de residuos que flanquean los extremos C- y N- terminal, figura común de los péptidos MHC clase II (Suri et al., 2006). De los péptidos presentados, solo un 21% de ellos lo hizo como secuencia única.

Tabla 5. Características de las muestras de tejido sinovial y descripción de los péptidos y proteínas obtenidas en el análisis de espectrometría de masa

Muestras	AR 12	AR7	AR16
Sexo	Femenino	Femenino	Femenino
Haplotipo	DRB1*01:01 DRB1* 07:01	DRB1*04:01 DRB1*04:07	DRB1*03:01 DRB1*14:01
Número de péptidos	36	18	87
Número de proteínas parentales	12	9	9
Secuencias únicas	7 (19%)	7 (39%)	6 (6,9%)
Familias de péptidos	29 (81%)	11 (61%)	81 (93,1%)
Péptidos por proteína	1 a 14	1 a 7	1 a 16
Familia de péptidos por proteína	2 a 14	2 a 7	2 a 65
Total péptidos	141		
Total proteínas	30		

1.4.1. Distribución por tamaño de los péptidos

Para profundizar y describir qué péptidos son presentados en el tejido sinovial de pacientes AR, se realizó un estudio en la distribución por tamaño de los péptidos encontrados. La distribución por tamaño de los péptidos en tejido sinovial fue variable, cada paciente mostró un patrón diferente (Figura 5). En el caso del tejido del paciente AR12, la mayoría de los péptidos encontrados se concentran en dos grupos de péptidos, uno de un tamaño de 14 aa (38,9%) y el otro de un tamaño de 16 aa que alcanza un 30% del total. En el paciente AR7 se observa una distribución homogénea en los grupos de péptidos de 13 a 17 aa, con un porcentaje de péptidos muy similar entre ellos. En el paciente AR16, se observa que un 73% de los péptidos encontrados presentan un tamaño de 16 aa. En este caso, se observa que casi un 70% de los péptidos encontrados pertenecen a una misma secuencia peptídica de la proteína serotransferrina. (Anexo 2). Al observar la distribución total, vemos que la longitud de los péptidos encontrados se encuentra dentro del rango estándar de los péptidos unidos a las moléculas MHC clase II que va de 10 a 27 aa (Suri et al., 2006), con un promedio de tamaño de 16 aa (Figura 5).

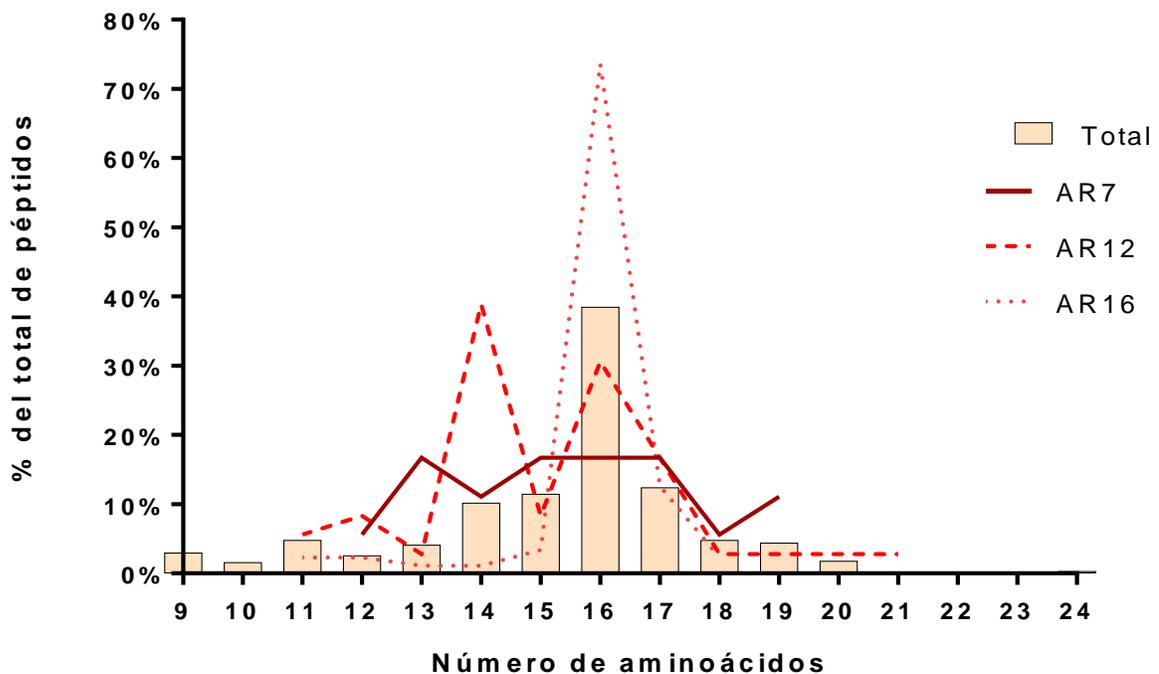


Figura 5. La distribución por tamaño de los péptidos asociados a la molécula HLA-DR en tejido sinovial AR se encuentra dentro de los rangos estándar. Distribución por tamaño de las secuencias peptídicas obtenidas desde muestras de tejido sinovial de pacientes con AR. Cada línea representa el porcentaje del total de péptidos según tamaño de secuencia, para cada tejido. La barra representa la distribución por tamaño de los péptidos de las tres muestras en conjunto.

1.4.2 Distribución por vía de procesamiento

Mediante la herramienta bioinformática Uniprot estudiamos la procedencia del repertorio peptídico asociado a las moléculas HLA-DR en tejido sinovial, para lo cual se agrupó a los péptidos según el compartimiento celular de origen de la proteína parental para clasificarlos acuerdo a la vía de procesamiento (Figura 6) Los

compartimentos de membrana, extracelular/secretor, aparato de Golgi, retículo endoplásmico y endosoma/lisosoma corresponden a la vía endocítica. Los compartimentos de núcleo, citosol/citoplasma y mitocondria están canónicamente asociados a la vía citosólica.

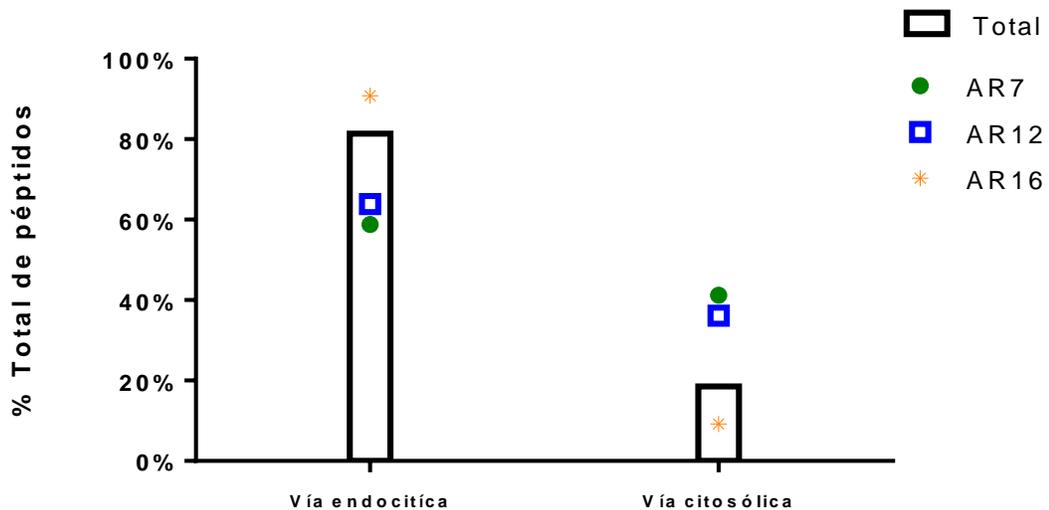


Figura 6. Los péptidos encontrados asociados a HLA-DR en tejido sinovial AR derivan en su mayoría de la vía de procesamiento endocítica.

Porcentaje de péptidos asociados a HLA-DR encontrados en tejido sinovial de pacientes AR según el origen de la proteína parental. Cada símbolo representa el porcentaje de péptidos según localización para las distintas muestras. La barra representa porcentaje del total de muestras en conjunto.

En las muestras de los pacientes AR7 y AR12, un 60% de los péptidos provienen de la vía endocítica y un 40% restante proviene de proteínas derivadas de citosol. En el caso del paciente AR16, un 80% de los péptidos proviene de la vía endocítica. Estos resultados guardan relación con la función de la molécula HLA-DR en el procesamiento y presentación antigénica de péptidos procesados por la vía

endocítica, especialmente aquellos endocitados desde el medio extracelular (Neefjes et al., 2011).

Al analizar las proteínas parentales según compartimento celular (Figura 7), se observa que aproximadamente un 70% de los péptidos proviene de proteínas derivadas del medio extracelular, -en particular en el paciente AR16-, en que un 90% de las proteínas encontradas derivan de este compartimento. Esto se debe a que en este tejido se observan gran cantidad de péptidos derivados de la proteína serotransferrina. En el paciente AR12, en cambio, casi un 40% de los péptidos encontrados derivan de proteínas de membrana y sólo un 20% deriva de proteínas del medio extracelular. Además en este paciente se observa un aumento de proteínas derivadas de núcleo en comparación al resto. Finalmente, en el paciente AR7 se observa un aumento en proteínas derivadas del citosol (40%) (Figura 7).

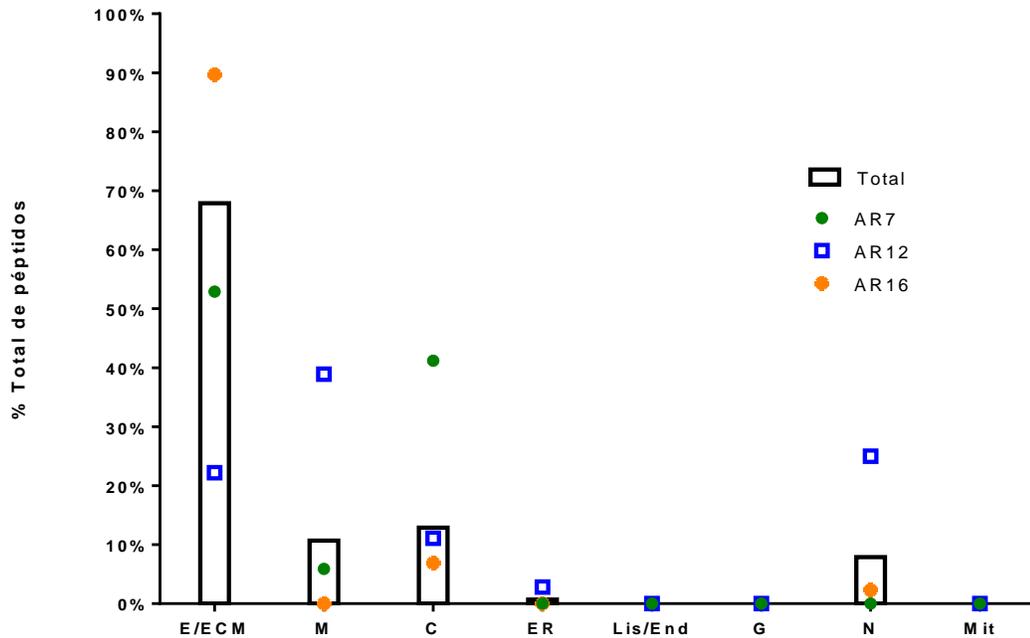


Figura 7. La mayoría de los péptidos encontrados asociado a la molécula HLA-DR de tejido sinovial de paciente AR derivan proteínas solubles del medio extracelular o de matriz extracelular. Localización sub-celular de las proteínas parentales de los péptidos asociados a HLA-DR en muestras de tejido sinovial de pacientes AR. Cada símbolo representa el porcentaje del total de péptidos de una muestra. La barra representa el porcentaje de los péptidos de las tres muestras en conjunto. E/ECM: Medio extracelular o matriz extracelular, M: Membrana, C: Citosol, ER: Retículo Endoplasmático, Lis/End: Lisosoma o Endosoma, G: Golgi, N: Núcleo y M: Mitocondria.

1.4.3 Distribución por tipo de unión a las moléculas HLA-DR

De acuerdo a los criterios descritos en la sección Material y Métodos (sección 11), se utilizaron tres programas bioinformáticos para predecir el grado de afinidad de las secuencia peptídica a determinados alelos de la molécula HLA-DR: Propred, NetMHC II 2.0 y SYFPEITHY. Se utilizó en programa TEPITOPE para obtener el

“core” de cada secuencia. Según estos tres programas se clasificó el tipo de unión para cada alelo en indeterminado (ID), de alta afinidad (AA), de afinidad intermedia (AI) o de baja afinidad (AB). Se asignó la secuencia peptídica al alelo que presentó mayor afinidad por dicho péptido. Los alelos HLA-DR de cada uno de los pacientes desde donde se extrajo el tejido sinovial fueron los siguientes. Los alelos estudiados fueron tejido AR12, DRB1*01:01 y DRB1*07:01.; tejido AR16 DRB1*03:01 y DRB1*14:01; tejido AR7 DRB1*04:01, DRB1*04:07 y ¿El alelo DRB1*14:01 no se encuentra descrito en los programas de predicción de afinidad ProPred ni SYFPEITHY, por lo que un 32% de las secuencias no se pudo determinar el alelo. Casi un 40% de las secuencias peptídicas fueron consideradas de doble unión, ya que ambos alelos presentaban un mismo tipo de unión por el péptido.

Al analizar el total de péptidos, vemos que casi un 40% de ellos presenta un tipo de unión ID, lo que se produce por la presencia del alelo DRB1*14:01 (por esta razón vemos que el paciente AR16 presenta un 100% de unión ID) (Figura 8). Al analizar por paciente, vemos que el paciente AR12 (DRB1*01:01; 07:01) tiene casi un 60% de las secuencias peptídicas en un tipo de unión AA. En el caso del paciente AR7 (DRB1*04:01; 04:07) presenta un 40% de las secuencias en unión AI y un 60% en unión AB (Figura 8).

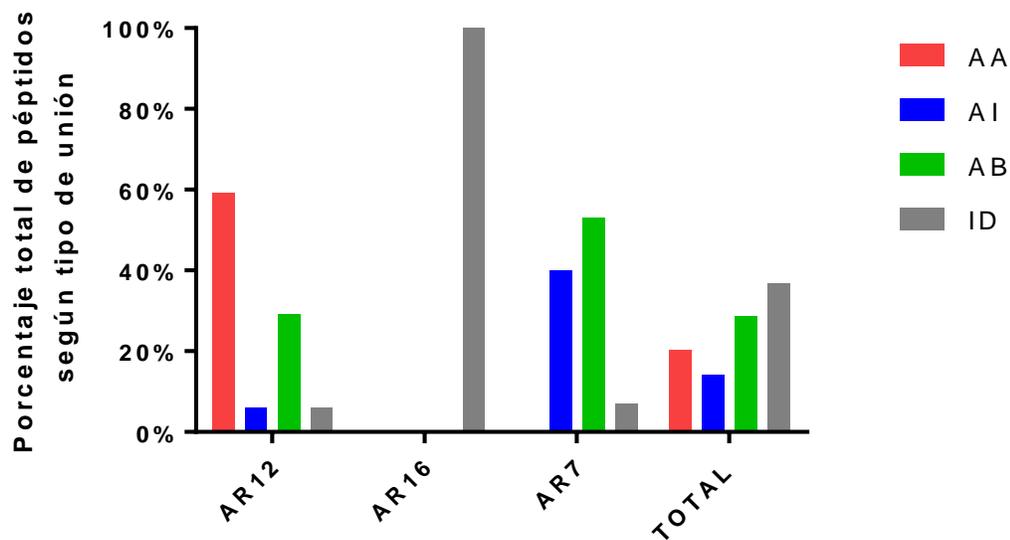


Figura 8. Porcentaje de péptidos según tipo de unión en las muestras de tejido sinovial de pacientes AR. Cada barra representa el porcentaje de péptidos según afinidad de unión. Los péptidos fueron agrupados por grado de afinidad. El grado de afinidad se obtuvo mediante las herramientas bioinformáticas PROPRED, SYFPEITHY y Net MHCII Pan 2.1, determinando 4 categorías: Afinidad alta (AA), intermedia (AI), baja (AB) e indeterminada (ID).

Posteriormente, analizamos el tipo de unión según alelo (Figura 9). Vemos que en el alelo DRB1*01:01, cerca de un 60% de las secuencias presentadas en él, presentan un tipo de unión AA. En el caso del alelo DRB1*04:01, un 63% de las secuencias presenta una AI. En los alelos DRB1*03:01, DRB1*04:07 y DRB1*07:01, la mayoría de las secuencias peptídicas presentadas en estos alelos poseen un tipo de unión AB (88%, 63% y 41,1% respectivamente). En el caso particular del paciente AR16, cuyo haplotipo es DRB1*03:01/14:01, los péptidos podrían estar asignados al alelo DRB1*14:01, debido a la afinidad baja que presentaron al alelo DRB1*03:01. En conclusión, los alelos del EC que se estudiaron en las muestras de tejido sinovial de pacientes con AR, presentan una afinidad teórica más alta por las secuencias

peptídicas. Este tipo de unión es predominantemente AA en el caso del alelo DRB1*01:01 y AI en el caso del alelo DRB1*04:01.

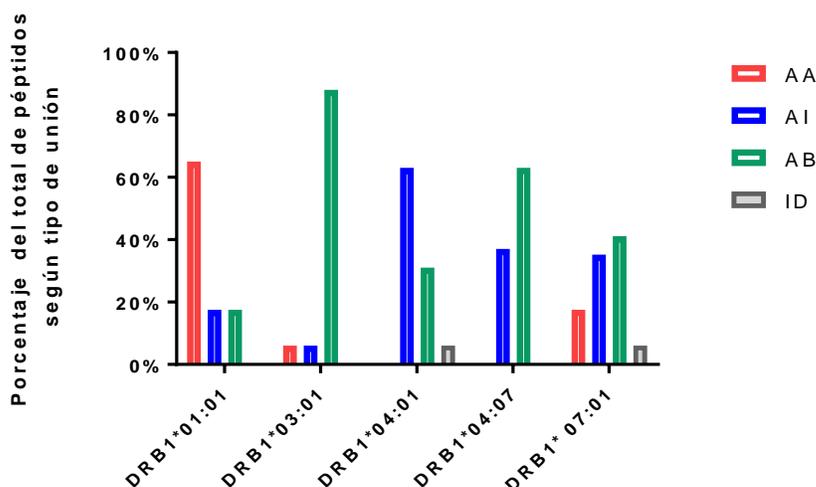


Figura 9. Los alelos de EC presentan un tipo de unión más afín por secuencias peptídicas presentadas en tejido sinovial de pacientes AR. Cada barra representa el porcentaje de péptidos según afinidad de unión. Los péptidos fueron agrupados según alelo. El grado de afinidad se obtuvo mediante herramientas bioinformáticas, determinando 4 categorías: Afinidad alta (AA), intermedia (AI), baja (AB) e indeterminada (ID).

También evaluamos el tipo de unión presentada por el repertorio peptídico del tejido sinovial en relación a la procedencia de la proteína parental y comparamos el tipo de unión con la vía de degradación (Figura 10). La vía citosólica presenta en su mayoría péptidos de unión AB, un 60% de las secuencias de esta vía de degradación presenta esta unión. En la vía endocítica, en cambio, se observan un 32% de péptidos en unión AA y 20% de uniones AI. En comparación a la vía citosólica, el porcentaje de uniones de tipo AB es mucho menor. Las uniones ID en ambas vías

tienen un porcentaje significativo (39% y 35%, respectivamente) y esto estaría dado por el hecho de que el alelo DRB1*14:01 no está incluido en las herramientas bioinformáticas utilizadas en este análisis y no se pudo determinar el tipo de unión.

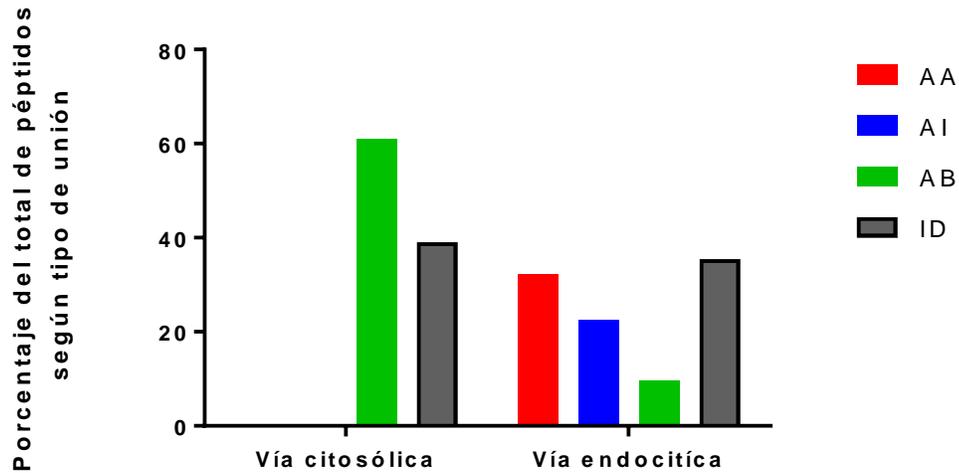


Figura 10. La vía endocítica presenta péptidos con tipo de unión de afinidad alta e intermedia, en tejido sinovial de pacientes AR. Cada barra representa el porcentaje de péptidos del total según tipo de unión. Los péptidos fueron agrupados por la vía de degradación de la proteína parental.

Nuestro objetivo era estudiar los alelos de susceptibilidad para AR del EC, mediante el estudio *in situ* del tejido sinovial de pacientes AR. Al comparar la localización subcelular del repertorio peptídico según la proteína parental y los alelos del EC (DRB1*01:01, paciente AR12 y DRB1*04:01 paciente AR7), observamos que la mayoría de los péptidos que presentan una unión AA provienen del compartimiento extracelular y de membrana plasmática (Figura 11). Las uniones AI, en el caso del alelo DRB1*04:01, provienen en su mayoría del medio extracelular. Las uniones AB provienen de la vía citosólica (Figura 11). Todos estos resultados nos muestran que los péptidos de afinidad alta e Intermedia provienen de la vía endocítica, lo que tiene relación con la función biológica de la molécula HLA-DR

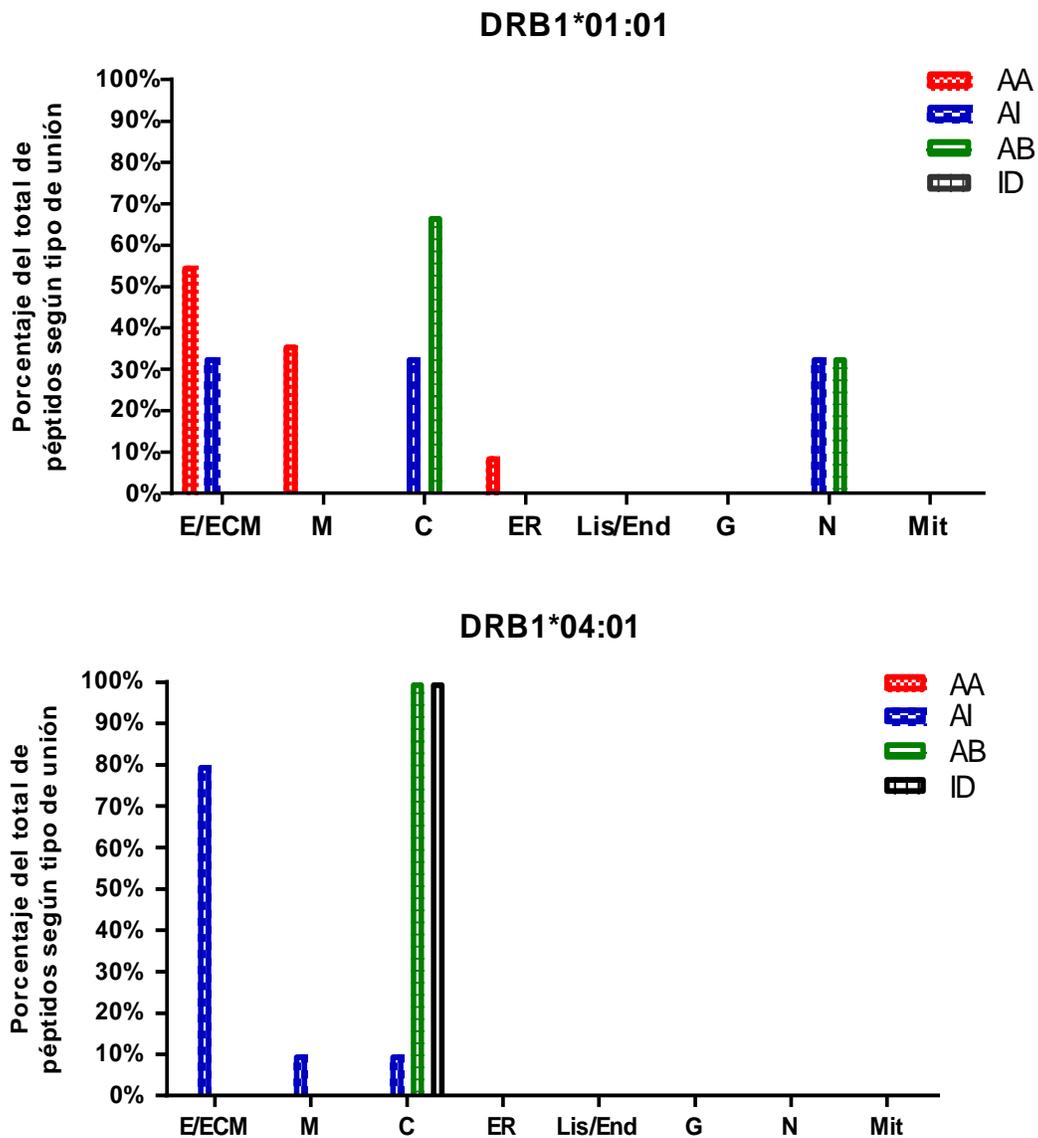


Figura 11. Los péptidos que presentan afinidad alta e intermedia en alelos del EC provienen en su mayoría de medio extracelular en muestras de tejido sinovial de pacientes AR. Tipo de unión de los péptidos para alelos del EC según localización de la proteína parental de muestras de tejido sinovial. Cada barra representa el porcentaje del total de péptidos según grado de afinidad teórica (AA, AI, AB e ID) para cada alelo del EC, según la localización subcelular de la proteína parental.

El programa bioinformático DAVID a través de su función *Functional Annotation Clustering* nos entregó información sobre qué procesos biológicos están favorecidos en las proteínas parentales de los péptidos asociados a HLA-DR encontrados en las muestras de tejido sinovial de los pacientes AR7, AR12, AR16. Debido al número pequeño de secuencias peptídicas encontradas en el tejido se analizó todas las secuencias encontradas en conjunto. El enriquecimiento relativo de estos procesos fue medido por un puntaje obtenido desde un análisis sistémico de esta base de datos (Huang et al., 2009). Los grupos con un grado de enriquecimiento igual o superior a 1,9 fueron considerados en este análisis. Se utilizó como filtro un umbral alto para agrupar las proteínas (Tabla 6).

Tabla 6. Grado de enriquecimiento funcional de las proteínas parentales de los péptidos presentados por HLA-DR en muestras de tejido sinovial de pacientes AR. El grado de enriquecimiento fue obtenido utilizando la función “Clustering” del programa bioinformático DAVID.

Cluster funcional	Puntaje de enriquecimiento Tejido Sinovial
Respuesta Inflamatoria	4.49
Proteínas Secretadas	3.83
Péptidos señal	2.71
Vía clásica del complemento	2.23
Respuesta a iones	1.93

Los principales “Clúster” se agruparon en proteínas relacionadas con la respuesta inflamatoria y proteínas secretoras; proteínas del complemento C3 y C1q, proteína C reactiva, fibronectina 1 y serotransferrina, entre otras, lo que guarda relación con el proceso inflamatorio presente en estos tejidos, teniendo en cuenta que son pacientes que llevan un largo periodo de evolución de la enfermedad y por lo

tanto el grado de inflamación y destrucción es muy elevado. También relacionado con un proceso inflamatorio destaca el “clúster” de proteínas del Complemento. Además, encontramos un grupo de proteínas asociadas a iones; Actina, Conectina y Fibrinógeno.

Al analizar con detenimiento, nos enfocamos en las secuencias peptídicas más frecuentes presentes en estos tejidos, observando que están relacionadas con proteínas de la respuesta inmune y procesos inflamatorios (Tabla 7). También analizamos si existían proteínas comunes entre las muestras de tejido (Tabla 8). Fue interesante notar que entre las proteínas comunes hay auto-antígenos previamente descritos en AR, como es el caso de la filagrina y la fibronectina.

En conclusión, se observa secuencias peptídicas provenientes de proteínas de la respuesta inflamatoria. La distribución por tamaño de estas secuencias no es homogénea entre los tejidos estudiados pero guarda relación con lo descrito para la molécula HLA-DR. La mayoría de las secuencias proviene de la vía endocítica y de manera particular del compartimento Extracelular. Las secuencias presentadas en los alelos pertenecientes a la EC, presenta un tipo de unión de Alta Afinidad (AA), lo que es muy interesante, ya que nos entregaría información sobre la presentación antigénica en estos alelos, la cual al presentar una mayor afinidad sería más estable la unión de complejo MHC/péptido facilitando su presentación.

Tabla 7. Proteínas de la respuesta inmune y procesos inflamatorios dieron lugar a los péptidos más abundantes asociados a HLA-DR en tejido sinovial de pacientes AR. El número en la tabla representa la cantidad de secuencias encontradas para esa proteína

Proteínas	AR12	AR16	AR7
	Número de secuencias	Número de secuencias	Número de secuencias
Región VH26 V-III de la cadena pesada Ig	14		
Fracción C3 complemento		10	
Serotransferrina		65	
Cadena gamma de fibrinógeno			7

Tabla 8. Proteínas parentales de péptidos asociados a HLA-DR comunes en tejidos sinoviales de pacientes AR. El número representa la cantidad de secuencias encontradas para esa proteína en cada muestra.

Proteínas	Tejidos		
	AR 12	AR16	AR7
Fracción del Complemento C3	1	10	
Factor de elongación 1 alfa	6		
Fibronectina	1		2
Filagrina 2		1	1

2. Peptidoma asociado a moléculas HLA-DR que presentan el EC desde células dendríticas de donantes sanos pulsadas con fluido sinovial de pacientes con AR.

Debido a la expresión variable de la molécula HLA-DR en tejido autoinmune (Muixi et al, 2008). Utilizamos como fuente de complejos HLA-DR/péptidos, células dendríticas derivadas de monocitos de donantes sanos que expresarán un alelo de EC. Estas células fueron cargadas con fluido sinovial de paciente AR, lo interesante es que estos fluidos pertenecían a los pacientes AR7 y AR12. De esta manera, obtuvimos una mayor cantidad de péptidos y nos permitió tener una visión de los procesos de procesamiento y presentación antigénica en alelos susceptibles a AR.

Como una primera etapa, estudiamos el fluido sinovial, buscamos donantes sanos positivos para alelos del EC. Posteriormente, se generaron CDs y se analizó el peptidoma asociado a la molécula HLA-DR.

2.1 Fluido sinovial

Se cuantificó la cantidad de proteínas contenida en el fluido sinovial de pacientes AR y pacientes OA pre-tratados con hialuronidasa (Tablas 9 y 10).

Tabla 9. Cuantificación de proteínas obtenidas desde fluido sinovial de pacientes AR

Muestra	Concentración de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
AR1	26,7
AR2	2,1
AR3	22,06
AR4	19,4
AR5	26,7
AR6	40,1
AR7	34,4
AR8	9,8
AR12	28,72
AR13	24,02
AR14	30,62
AR15	50,22

Tabla 10. Cuantificación de proteínas fluido sinovial de pacientes OA

Muestra	Concentración de proteínas (µg/µl)
OA1	26,7
OA2	2,1
OA3	22,06
OA4	19,4
OA5	26,7
OA6	40,1
OA7	34,4
OA8	9,8
OA9	28,72
OA10	24,02
OA11	30,62

Tanto el fluido sinovial de pacientes con AR y OA, presentan niveles bajos proteínas con respecto al plasma, lo que está de acuerdo con la biología de este fluido (Shmerling et al., 1990). En casos de inflamación, existe un aumento de proteínas de peso molecular elevado como fibrinógeno en pacientes AR. (Raijmakers et al. 2012) Para determinar la integridad de las proteínas presentes en el fluido se realizaron electroforesis en gel SDS/PAGE al 12% denaturante. Debido a la gran concentración de proteínas se trabajó con una dilución 1:20 del fluido. Se observó un trazado electroforético con gran variedad de proteínas, sin signos de degradación debido a la incubación con la hialuronidasa (Figura 12).

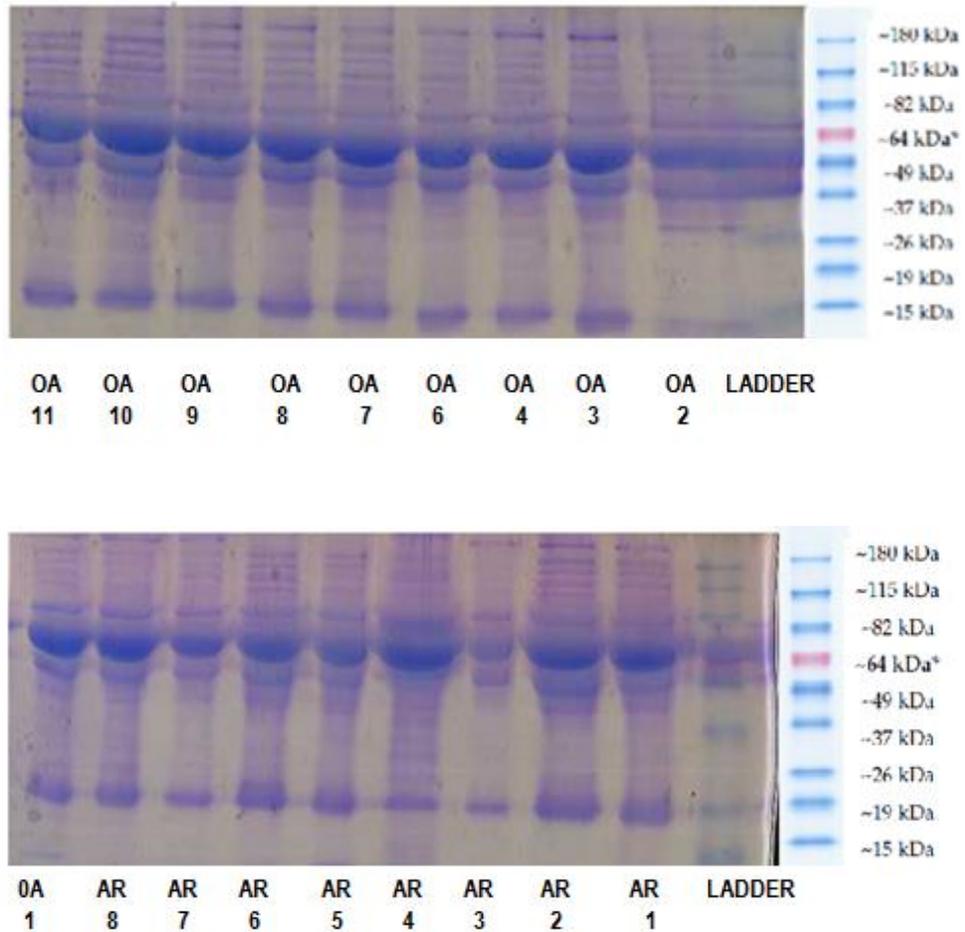


Figura 12. Electroforesis en gel SDS/PAGE al 12% de fluido sinovial de pacientes con AR y OA.

Se cuantificó la presencia de AAPC en fluido sinovial mediante técnica de ELISA, con el kit comercial Anti-MCV[®] (Orgentec, Diagnostika, Mainz-Hechtsheim, Germany), para la determinación de anticuerpos IgG anti-vimentina mutada citrulinada, de los siguientes pacientes: AR1, AR2, AR3, AR5, AR6, AR7, AR8, OA1, OA3, OA6 y OA11. Fueron considerados valores positivos, aquellos superiores a 20U/mL, según fabricante En la Tabla 11 se observa que 2 pacientes AR presentan

niveles positivos para AAPC en FS . Cabe señalar que este kit está adaptado para cuantificar anticuerpos en muestras de suero y plasma. Los niveles de proteínas presentados en FS son mucho más bajos que el suero o plasma, por lo tanto, este valor debería correlacionarse con la concentración de proteínas del FS. Los pacientes AR5 y AR6 presentan una alta concentración de proteínas.

Tabla 11. Cuantificación de anticuerpos AAPC en fluido sinovial pacientes AR y OA

Muestra	Concentración (U/ml)
AR1	5,4
AR2	8,3
AR3	6,8
AR5	39,1
AR6	20,1
AR7	9,1
AR8	10,1
OA1	5,6
OA3	4,2
OA6	5,4
OA11	4,8

2. 2 Genotipificación de donantes

Las muestras de sangre de 100 donantes sanos fueron amplificadas por PCR utilizando los partidores descritos en material y métodos sección 2.2. Como control positivo para cada reacción se utilizó DNA genómico, en el caso del serotipo DR1, DNA que contiene el haplotipo DR1*01:07/01:02, para el serotipo DR4, DNA que contiene el alelo DR1*04:07 y para el serotipo DR10, DNA que contiene el alelo DR1*10:01. De los 100 donantes, 15 donantes expresaban el serotipo HLA-DR1, 34 donantes expresaban el serotipo HLA-DR4 y 3 donantes expresaban el serotipo HLA-DR10. (Anexo 3 y Figura 13).

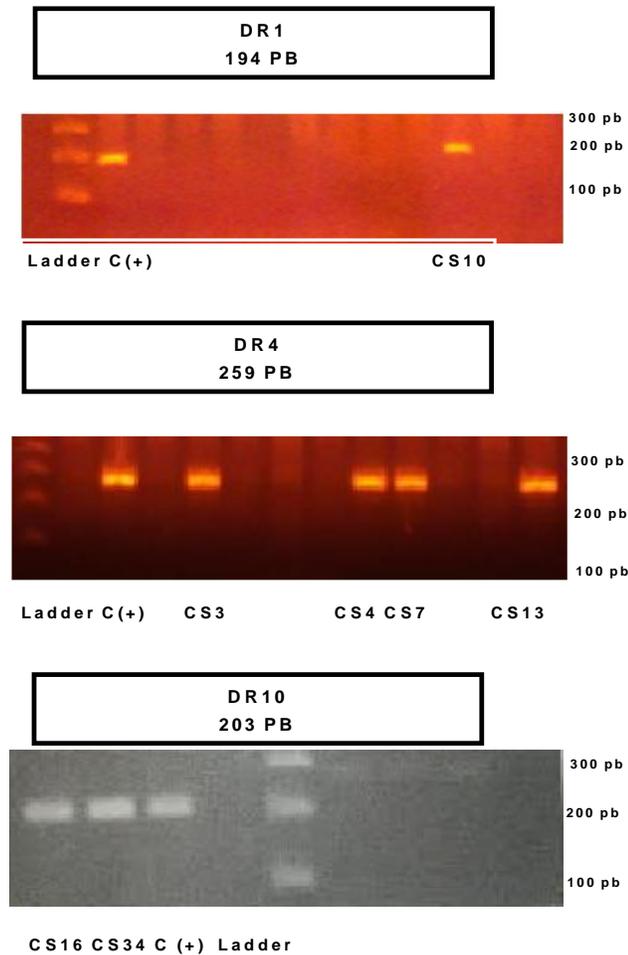


Figura 13. Gel de agarosa del producto de PCR para los serotipos DR1, DR4 y DR10. Electroforesis en gel de agarosa muestra una banda de 194 pb para el serotipo DR1, una banda de 259 pb para el serotipo DR4 y una banda de 203 pb para el serotipo DR10.

Se realizó la genotipificación a los donantes positivos a los serotipos estudiados mediante la técnica de PCR-SSO. (Tabla 12 y 13)

Tabla 12. Resultados genotipos de HLA-DRB1 de tejido mediante PCR-SSO

Muestras	Haplotipo
Tejido	
AR 02	DRB1*01:02, 04:07
AR 03	DRB1*08:02, 13:03
AR 07	DRB1*04:01, 04:07
AR 12	DRB1*01:01, 07:01
AR 16	DRB1*03:01, 14:01
OA 01	DRB1*01:03, 04:07

Tabla 13. Resultados genotipos de HLA-DRB1 donantes mediante PCR-SSO

Muestras	Haplotipo
Donantes	
CS 3	DRB1*01:01, 04:02
CS 10	DRB1*01:01, 11:04
CS 12	DRB1*01:01, 03:01
CS 16	DRB1*09:01, 10:01
CS 20	DRB1*01:01, 11:04
CS 30	DRB1*01:02, 04:03
CS 31	DRB1*01:01, 07:01
CS 34	DRB1*09:01, 10:01
CS 35	DRB1*01:01, 15:01
CS 47	DRB1*01:01, 11:04
CS 56	DRB1*01:02, 11:04
CS 79	DRB1*01:02, 11:04
CS 80	DRB1*10:01, 11:04
CS 86	DRB1*01:01, 03:01
CS 89	DRB1*01:02, 13:01

2. 3 Generación de células dendríticas desde monocitos pulsadas con fluido sinovial

2.3.1 *Purificación de monocitos*

Se seleccionó a los donantes DC10, DC16 y DC31 quienes mediante proceso de leucoféresis, se obtuvo concentrado de los leucocitos y desde allí se aislaron monocitos, según protocolo descrito en Material y métodos sección 2.3. El porcentaje de monocitos fue obtenido por medio de citometría de flujo y se realizó antes de cultivar las células para su diferenciación a CDs. Como marcadores de diferenciación se utilizó CD14 y CD11c. La estrategia de análisis que se utilizó, fue la selección de la población viable según patrón de dispersión de luz FSC/SSC, luego se seleccionó la población que presentó una mayor complejidad por patrón de dispersión de luz FSC/SSC y se midió los niveles de expresión de las moléculas CD14 y CD11c (Figura 14). El grado de pureza de los monocitos fue de 78% según la expresión del marcador CD14 y de un 85,3% por el marcador CD11c.

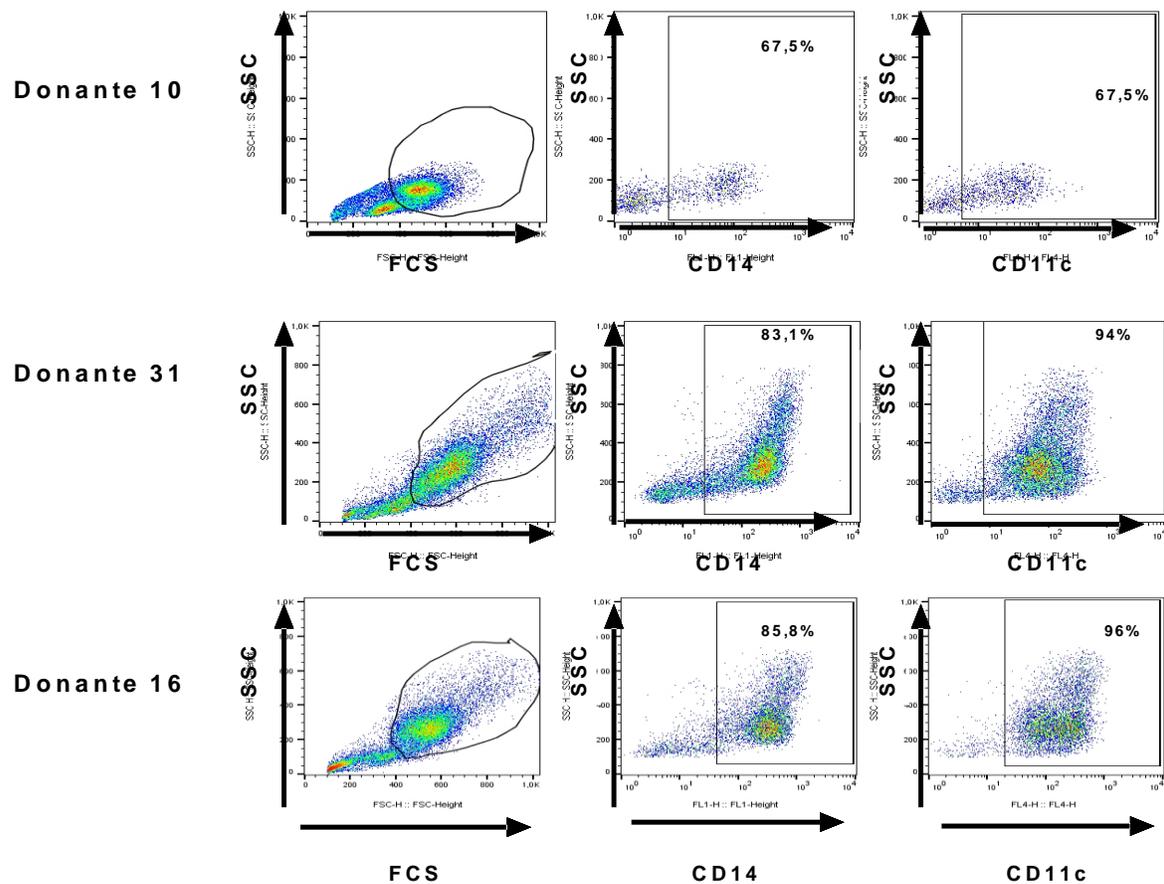


Figura 14. Purificación de monocitos. Análisis mediante citometría de flujo de los niveles de pureza de monocitos basados en el patrón de dispersión de luz FCS/SSC y la expresión de los marcadores de linaje CD14 y CD11c.

2.3.2 Fenotipo de células dendríticas

Se utilizaron 3 donantes sanos en cuyos haplotipos al menos un alelo pertenecía al EC (Tabla 13). Se generaron las CDs con dos condiciones, la primera utilizando 200 mg/dl de fluido sinovial de paciente AR (ver Material y métodos, sección 3.3) y LPS para activar su maduración y la segunda sólo con LPS.

Se estudió el fenotipo de las CDs derivadas de monocitos y pulsadas con fluido sinovial, después de 5 días de cultivo con medio AIM-V y citoquinas IL-4 y GM-CSF. La cantidad de células vivas obtenidas en cada donante según condición está en descrita en la Tabla 14. Para una completa caracterización de las CDs obtenidas se realizó citometría de flujo para medir porcentaje e Intensidad media de fluorescencia (MFI) de marcador de linaje (CD11c), marcador de co-estimulación (CD86), marcador de presentación antigénica (HLA-DR), marcador de maduración (CD83) y del marcador de activación funcional (CD40). En el caso de la molécula HLA-DR, nos permitió cuantificar su expresión para el desarrollo de experimentos posteriores, relacionados con el peptidoma asociado a esta molécula (Figuras 15 y 16).

Se utilizó como estrategia de análisis la selección de la población viable mediante patrón de dispersión de luz FSC/SSC para luego seleccionar la población de células dendríticas comparando las dispersión lateral de la luz (SSC) y la expresión del marcador de linaje CD11c. La expresión del marcador CD11c en la población de CDs fue de un 98%. Posteriormente, a partir de esta población se realizaron los análisis de expresión de los marcadores estudiados mediante histograma y se comparó la expresión de las CDs pulsadas y no pulsadas en cada donante. En las Figuras 15 y 16, llama la atención la expresión más intensa de este marcador de activación CD83 en el donante 10 en comparación a los otros dos donantes, pero podría tratarse de una condición propia del donante y que para el objetivo de este estudio no influenciaría los resultados. El antígeno CD86, marcador de co-estimulación, posee una expresión intensa en los tres donantes y no hay una diferencia entre una condición y otra. El antígeno CD40 se encuentra expresado en

los tres donantes. La molécula HLA-DR esta expresada en los tres donantes y al evaluar la expresión de ésta en el grupo de CDs pulsadas con fluido sinovial, observamos que presenta una intensidad de expresión del marcador menor al grupo de las CDs no pulsadas. Este hallazgo fue observado en los tres donantes y podría atribuirse a la presencia de factores anti-inflamatorios en el fluido sinovial, pero habría que realizar un estudio más profundo.

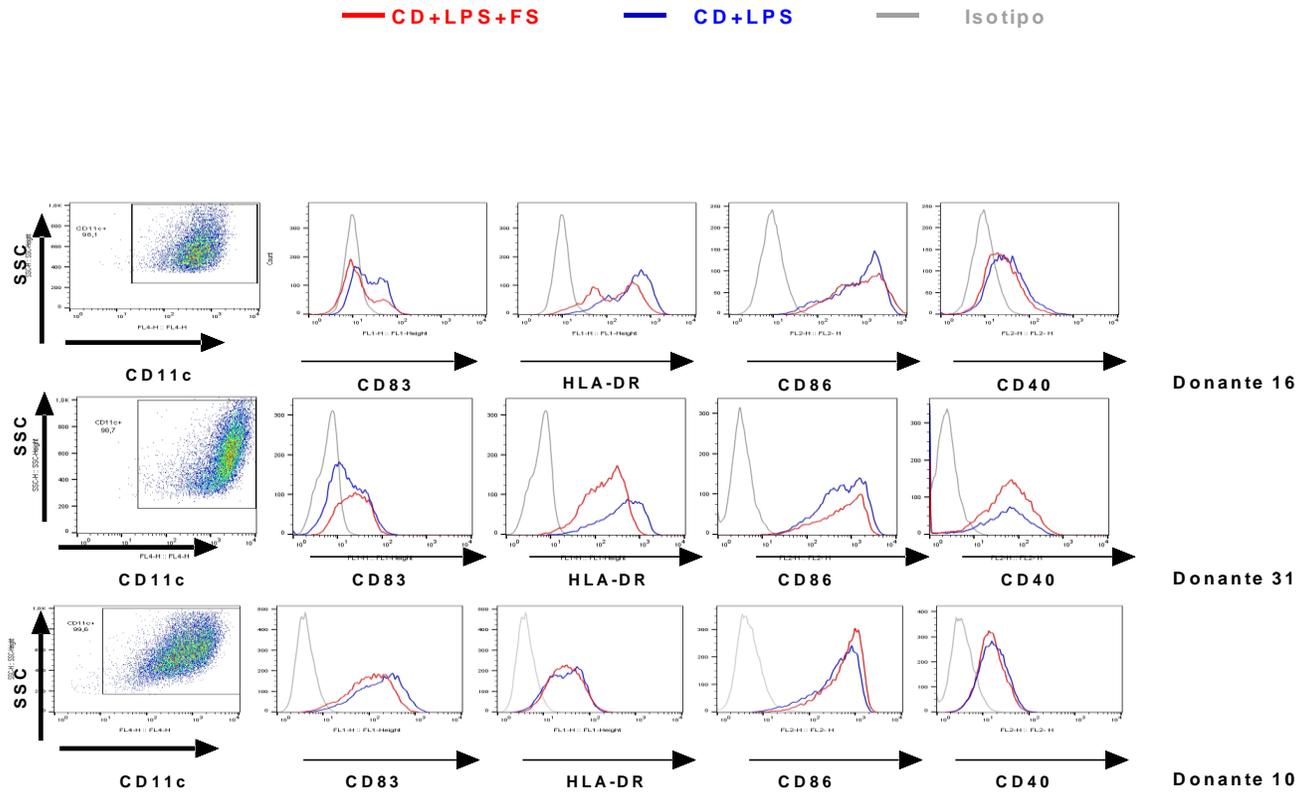


Figura 15. Expresión de los marcadores de linaje, maduración, HLA-DR, co-estimulación y activación funcional de las CDs de 3 donantes sanos. Se seleccionó la población según patrón de dispersión de luz FSC/SSC y expresión del marcador CD11c (columna izquierda) y se determinó la expresión de los marcadores CD83, HLA-DR, CD86 y CD40 (histogramas). La línea gris indica la intensidad de fluorescencia del isotipo para cada marcador, la línea roja representa las CDs pulsadas con fluido sinovial y la línea azul indica las CDs no pulsadas.

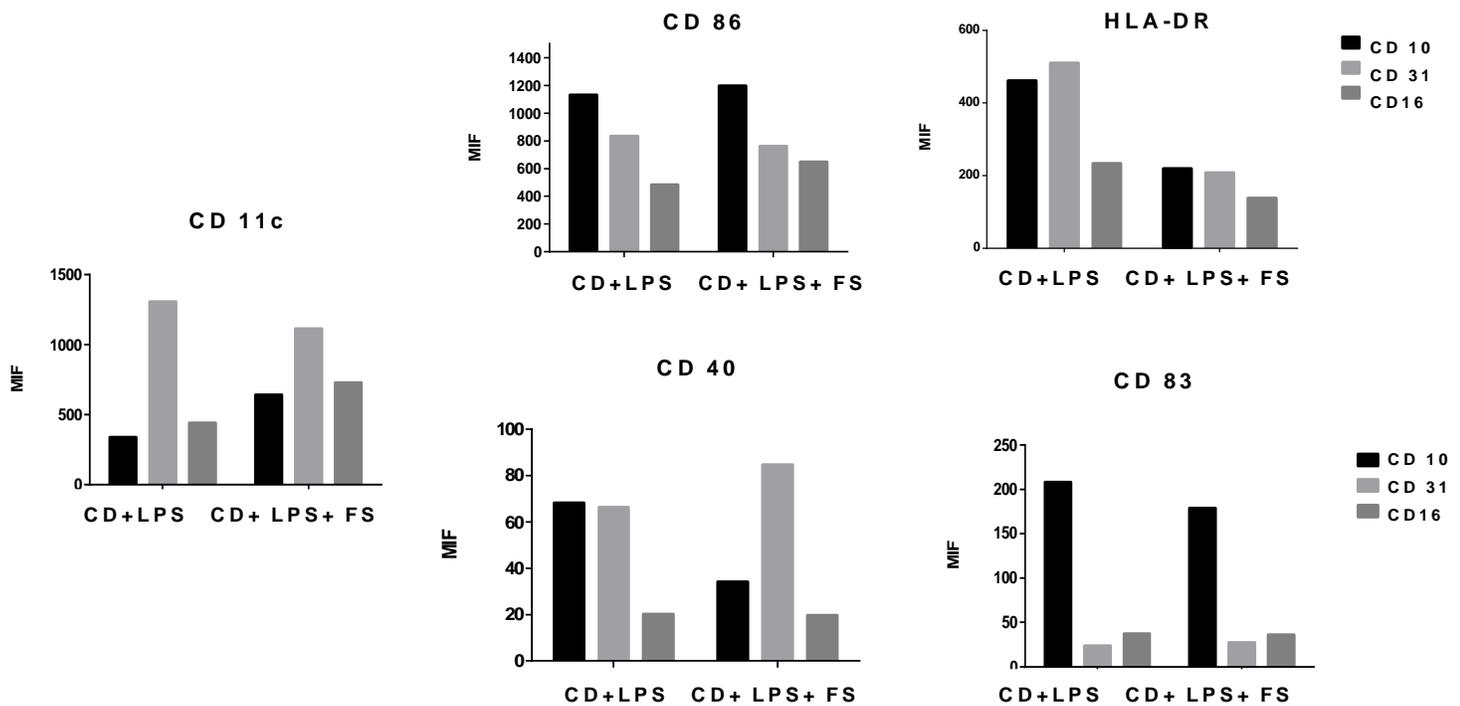


Figura 16. Análisis de la expresión de los marcadores CD86, CD83, CD40, HLA-DR y CD11c en CDs pulsadas o no con fluido sinovial. En las CDs pulsadas con fluido sinovial de los 3 donantes se observa disminución en la expresión de la molécula HLA-DR. Cada barra indica el MIF de cada donante según condición.

También se realizó estudio de viabilidad de las CDs obtenidas, que en el caso del donante 16 no se pudo realizar. Se utilizaron las tinciones con 7AAD y Anexina V para medir los niveles de muerte celular y apoptosis respectivamente. Estos marcadores fueron medidos al momento de cosechar las CDs y se realizó para ver si el proceso de pulso con fluido sinovial afecta la viabilidad celular (Figura 17). El donante CD10 presentó los niveles más altos de muerte celular en el grupo de las CD pulsadas con fluido sinovial, con una viabilidad sólo del 31,5%. En el caso del donante CD 31 no se observa este tipo de diferencia, y el porcentaje de viabilidad en ambos tratamientos alcanza el 50% (Figura 17).

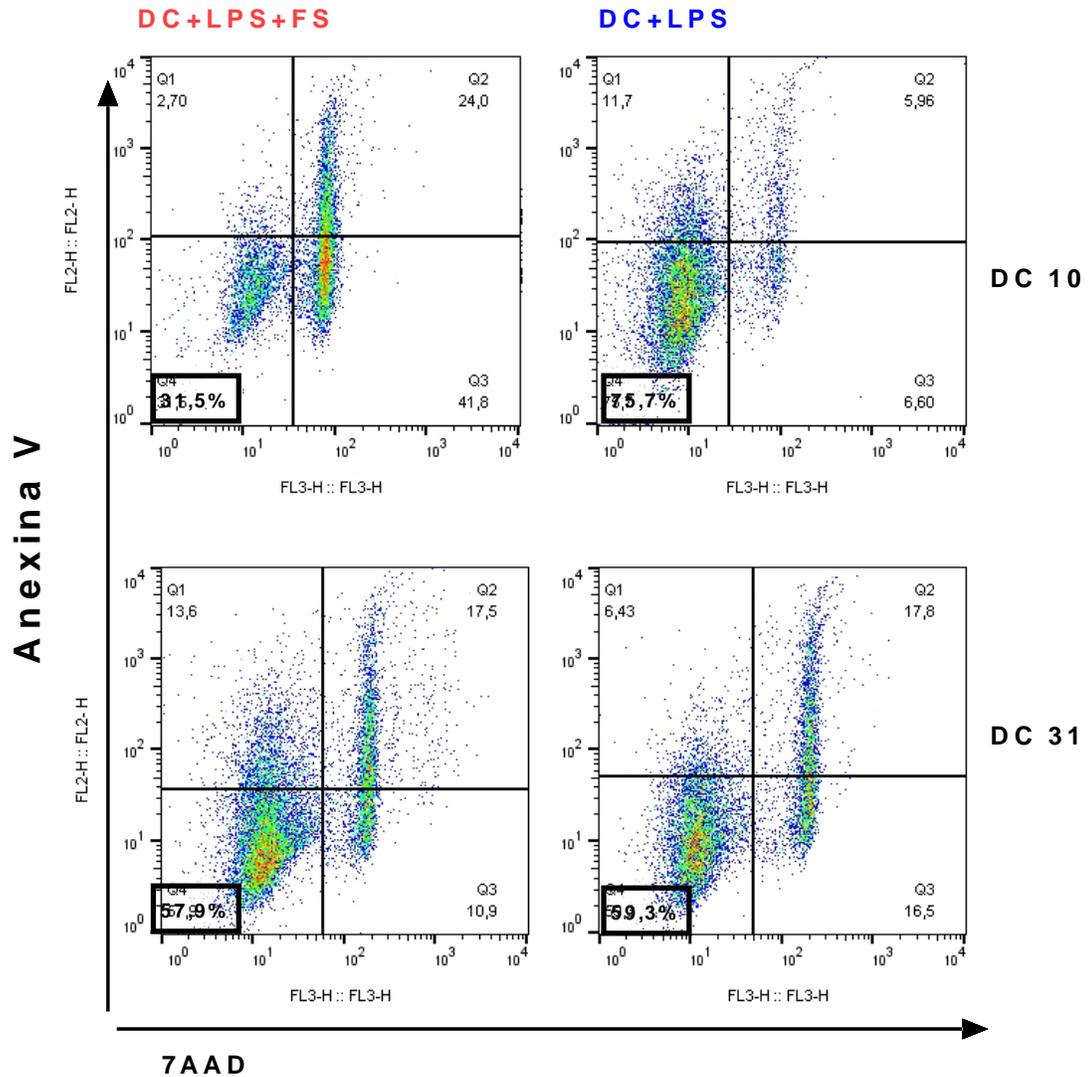


Figura 17. Viabilidad de las CDs pulsadas y no pulsadas con fluido sinovial, de los donantes CD10 y CD31. Mediante citometría de flujo se midió la viabilidad de las células dendríticas generadas a través de las tinciones con 7AAD y Anexina V. En ella se observa un porcentaje de viabilidad cercano al 50% de total.

Para la elección del fluido sinovial para pulsar las células dendríticas se utilizó como criterio, que este fluido pertenezca a un paciente cuyo tejido haya sido analizado por espectrometría de masas, (AR7 y AR12). Y el caso especial del donante CS31, tanto fluido como CDs presentaban mismo haplotipo. De esta manera, quisimos observar si existía un grado de coincidencia en ambas muestras y de manera indirecta ver si el proceso de carga de fluido sinovial en las CDs fue efectivo.

Tabla 14. Listado de células dendríticas de donantes cargadas con fluido sinovial

Donante	Haplotipo donante	Fluido Sinovial	Haplotipo fluido	Número de células obtenidas
CS10	DRB1*01:01/11:04	AR6	No secuenciado	9,26x10 ⁷ células
CS16	DRB1*09:01/10:01	AR7	DRB1*04:01/04:07	9,3x10 ⁷ células
CS31	DRB1*01:01/07:01	AR12	DRB1*01:01/07:01	1,56x10 ⁸ células

2.4 Descripción de los péptidos asociados a la molécula HLA-DR desde CDs de donantes sanos cargadas con fluido sinovial de pacientes AR.

El análisis fue hecho utilizando el espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap. Los péptidos que aparecieron dentro de la pre-columna fueron eliminados al igual que los péptidos derivados de proteínas específicas de la piel, como queratina, considerada un contaminante. Además se eliminaron las secuencias peptídicas menores a 9 aá y aquellas secuencias peptídicas cuyo residuo P₁ del *core* no correspondiera a uno de los siguientes aminoácidos; Metionina (Met), Fenilalanina (Phe), Isoleucina (Ile), Leucina (L), Valina (Val), Tirosina (Tyr) y Triptófano (Trp). Según Sturniolo (Sturniolo et al 1999), estos aminoácidos son encontrados en los residuos P₁ en una proporción significativa de secuencias que presentan uniones de alta afinidad, por lo tanto, sólo estos aminoácidos deben considerarse en el residuo P₁. El listado completo de péptidos se encuentra en Anexo 4.

Se obtuvo un total de 1035 péptidos derivados de 197 proteínas. Del donante CD31 se obtuvo un total de 592 péptidos derivados de 103 proteínas; del donante CD10, 86 péptidos desde 37 proteínas; y del donante CD16 se obtuvo 357 péptidos derivados de 57 proteínas. Un 78,5% de las secuencias peptídicas se presentó bajo la forma de *nested sets*, siendo el donante CD31 el que presentó un mayor porcentaje de péptidos en esta forma (91,5%). La muestra del donante DC10 presentó un porcentaje bajo de péptidos en *nested sets*, aproximadamente 58%, y estableciendo una diferencia entre las CDs pulsadas y no pulsadas (50,8% versus 66,6%, respectivamente). Por otra parte, el donante DC10 presentó cerca de un 40% de secuencias únicas. El donante CD16 presentó, al igual de que donante DC31, un

elevado porcentaje de péptidos presentados en *nested set*. Los *nested set* estaban compuestos de 2-97 péptidos (Tabla 15).

Tabla 15. Características de las muestras de CD de 3 donantes pulsadas con fluido sinovial de paciente AR y descripción de los péptidos y proteínas obtenida

Muestras	Donante 31		Donante 10		Donante 16	
Sexo	Femenino		Masculino		Masculino	
Haplotipo	DRB1*01:01		DRB1*01:01		DRB1*09:01	
	DRB1*07:01		DRB1*11:04		DRB1*10:01	
	FS+LPS	LPS	FS+LPS	LPS	FS+LPS	LPS
Número de péptidos (total)	282	310	56	30	255	102
Número de proteínas (total)	46	57	24	13	37	20
Secuencias únicas	24	26	27	10	28	19
	(8,5%)	(8,4%)	(48,2%)	(33,3%)	(10,9%)	(18,6%)
Familias de péptidos	258	284	29	20	227	83
	(91,5%)	(91,6%)	(50,8%)	(66,6%)	(89,1%)	(81,4%)
Péptidos por proteína	1 a 42	1 a 39	1 a 10	1 a 10	1 a 97	1 a 40
Péptidos por familia de proteína	2 a 42	2 a 34	2 a 10	2 a 10	2 a 97	2 a 40
Total péptidos	592		86		357	
	1035					
Total proteínas	103		37		57	
	197					

Sólo 4 proteínas comunes se encontraron en las CDs de los 3 donantes: aminopeptidasa, cadena alfa de la molécula HLA-DR, sintenina-1 e integrina M. Los donantes DC31 y DC10 compartían un alelo en común (DRB1*01:01) además de estas 4 proteínas en común, sólo en estos donantes se encontraban presentes las siguientes proteínas: integrina D, seroalbúmina, *non-POU domain-containing octamer-binding protein* y la cadena beta de la molécula HLA-DR. En la muestra del donante DC16 la mayoría de los péptidos encontrados provenía de proteínas relacionadas con el procesamiento antigénico. El péptido CLIP fue encontrado en la muestra del donante DC31. Las enzimas relacionadas con el procesamiento antigénico a nivel de la vía endocítica, las catepsinas, fueron encontradas en todas las muestras. Péptidos derivados de proteínas de células mieloides y CDs, como el receptor de manosa de macrófago 5, sólo fueron encontradas en el donante DC31. (Anexo 4)

2.4.1 Distribución por tamaño de los péptidos

La frecuencia de péptidos según tamaño sigue una distribución normal (Figura 18). Al analizar el porcentaje total de péptidos según tamaño de las secuencias, éste presenta un promedio de 16 aa de largo, figura descrita para péptidos asociados a molécula HLA-DR (Suri et al., 2006). En el donante 31, esta distribución se mantiene y no se observa ninguna diferencia entre la condición de CDs pulsadas y no pulsadas. En el donante 10, se observa un aumento en el porcentaje de péptidos de un largo de 9 aa (40%). En el caso de donante 16, las células pulsadas presentan un 47% de péptidos de un tamaño de 14 aa, en contraste con el grupo de células no pulsadas en donde la mayoría presenta un tamaño de 16 aa.

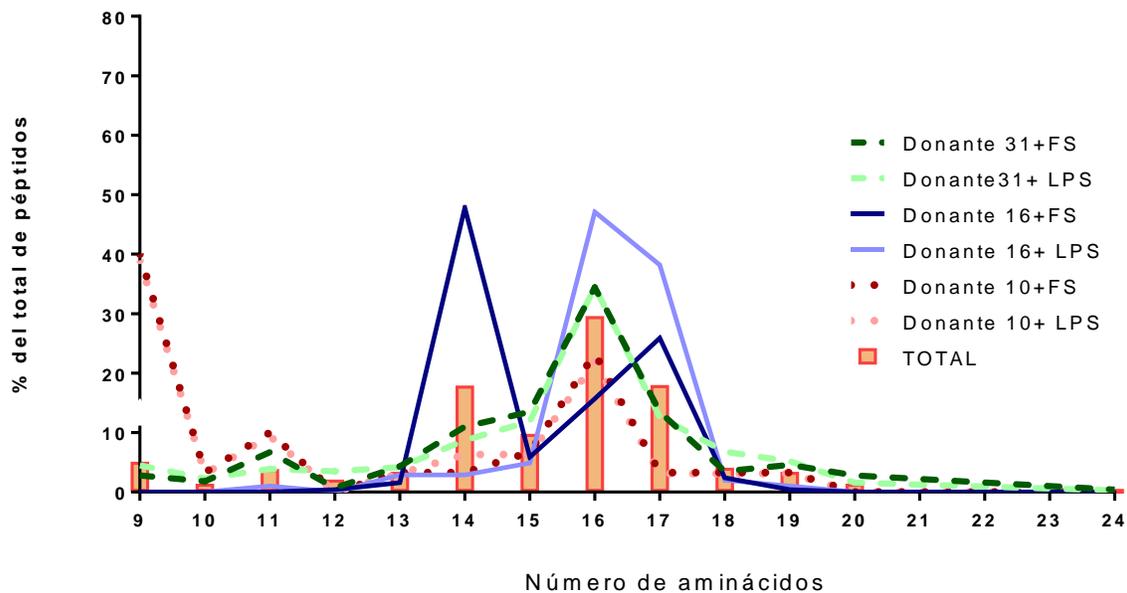


Figura 18. La distribución por tamaño de los péptidos asociados a la molécula HLA-DR de las CD pulsadas y no pulsadas con fluido sinovial se encuentra dentro de los rangos estándar. Distribución por tamaño de las secuencias peptídicas obtenidas desde CDs de 3 donantes. Cada línea representa el porcentaje del total de péptidos según tamaño de secuencia, para cada donante según condición. Las barras representan la distribución por tamaño del total de los péptidos.

En conclusión se observa una distribución normal de los péptidos según tamaño de secuencias. Se observan algunas diferencias en el grupo de las CDs pulsadas con fluido sinovial del donante DC16,. En los donantes 10 y 16 se observa un porcentaje mayor de péptidos de 16aa.

2.4.2 Distribución por vía de degradación

Analizamos la procedencia del peptidoma asociado a la molécula HLA-DR que presentan alelos de susceptibilidad, tanto en células pulsadas como no pulsadas con fluido sinovial. Es así que según la localización de la proteína parental clasificamos en vía endocítica y citosólica. La vía endocítica comprende las proteínas de origen de membrana, medio extracelular, retículo endoplásmico, Endosoma/Lisosoma y Aparato de Golgi. La vía citosólica comprende proteínas de citosol, núcleo y mitocondria (Figura 19).

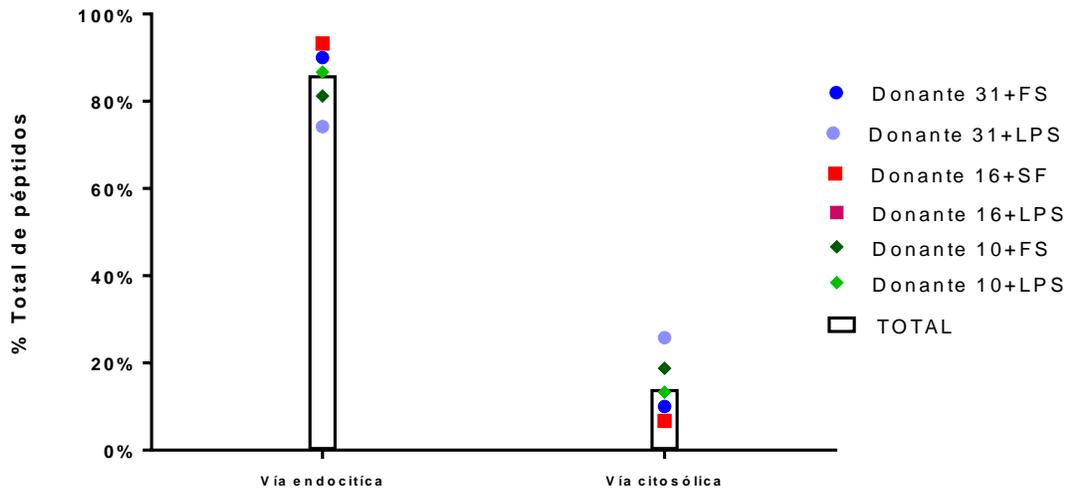


Figura 19. La mayoría de los péptidos encontrados provienen de la vía endocítica. Porcentaje de péptidos asociados a HLA-DR encontrados en CDs de donante sano, según el origen de la proteína parental. Cada símbolo representa el porcentaje de péptidos para las distintas muestras. La barra representa el promedio total. Las proteínas de la vía endocítica incluye proteínas de Membrana, Extracelular, Endosoma/Lisosoma, retículo endoplásmico y Aparato de Golgi. Y proteínas de la vía citosólica incluye proteínas de citosol, núcleo y mitocondria. LPS: lipopolisacárido. FS: fluido sinovial.

Un 86% de las secuencias totales encontradas proviene de la vía endocítica y un 14% proviene de la vía citosólica. En el donante DC16 se observa que un 93% de los péptidos encontrados en esta muestra provienen de la vía endocítica, no observándose una diferencia entre las células pulsadas y no pulsadas de este donante. También en el donante DC10 se observa un predominio de la vía endocítica sin diferencia en los subgrupos. El donante DC31 presenta un mayor porcentaje de péptidos que provienen de la vía citosólica en el grupo de células no pulsadas a diferencia del resto. Estos resultados guardan relación con la función de la molécula HLA-DR en el procesamiento y presentación antigénica de péptidos derivados del medio extracelular (Neefjes et al., 2011). También coinciden con los resultados obtenidos por el grupo de la Dra. Dolores Jaraquemada (Ciudad MT et. al, 2016) en donde un 80% de los péptidos aislados de CDs provenía de proteínas de la vía endocítica y un 20% de la vía citosólica.

Al enfocarnos por compartimento (Figura 20), casi un 70% de las secuencias provienen de proteínas de membrana, y en menor medida el resto de las secuencias provienen de proteínas de citosol y endosoma/lisosoma. En el donante DC16, un 87% de las secuencias provienen de proteínas de membrana. Los donantes DC10 y DC31, que expresan el alelo DRB1*01:01, presentan una distribución similar de las secuencias peptídicas según origen de la proteína parental, observándose un aumento de proteínas que provienen de núcleo y de mitocondria en comparación al donante DC16, en donde casi no se observan péptidos en estos compartimentos. El donante DC31 presenta en el grupo de células no pulsadas, un mayor porcentaje de secuencias provenientes de proteínas de citosol, núcleo y mitocondria en relación al grupo de células pulsadas con fluido sinovial. No se observan diferencias en la

distribución por compartimento entre el grupo de células pulsadas y no pulsadas en los donantes DC16 y DC10.

En resumen, las secuencias peptídicas encontradas en su mayoría provienen de la vía endocítica, en donde se observa que un 70% de las secuencias derivan de proteínas de membrana (Figura 20).

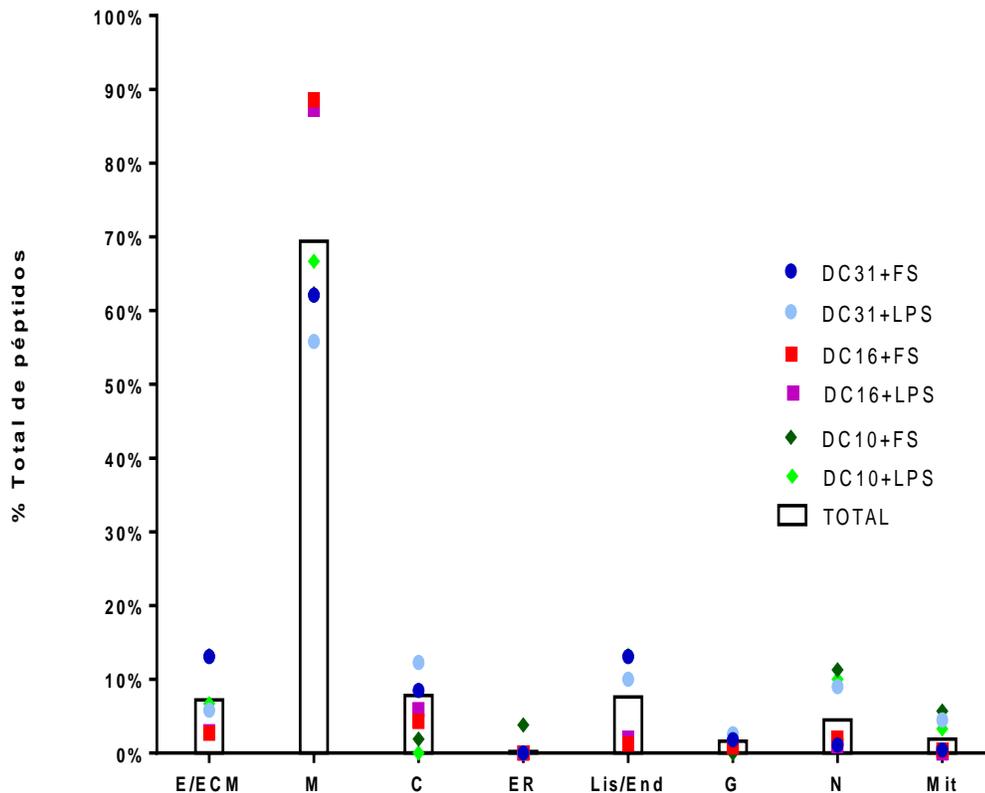


Figura 20. La mayoría de los péptidos asociados a moléculas HLA-DR en CDs proviene de proteínas de membrana. Gráfico que muestra el porcentaje de péptidos asociados a HLA-DR encontrados en CDs de donantes sanos, según el origen de la proteína parental. Cada símbolo representa el porcentaje del total de péptidos de una muestra distinta. La barra representa el porcentaje de todas las muestras en conjunto. Extracelular/Matriz extracelular (E/ECM), Membrana (M), Citosol (C), Retículo Endoplasmático (ER), Lisosoma/Endosoma (Lis/End), Golgi (G), Núcleo (N) y Mitocondria (Mit). LPS: lipopolisacárido. FS: fluido sinovial.

2.4.3 Distribución por tipo de unión

De acuerdo a los criterios descritos en material y método, para predecir el grado de afinidad de las secuencia peptídica a determinados alelos de la molécula HLA-DR, se utilizaron cuatro programas bioinformáticos: IEDB analyses resource, Propred, NetMHC II 2.0 y SYFPEITHY. Se utilizó el programa TEPITOPE para obtener el *core* de cada secuencia. El programa IEDB analyses resource se utilizó en reemplazo del programa Propred para determinar afinidad, debido que este último programa no describe los alelos DRB1*09:01 y DRB1*10:01 y necesitábamos un tercer programa para llegar a un consenso para definir tipo de unión. El programa Propred se utilizó para definir tipo de unión en los alelos DRB1*01:01, DRB1*07:01 y DRB1*11:04, además de indicar el grado de promiscuidad para los 51 alelos HLA-DR descritos en este programa. Se asignó el tipo de unión, considerando dos o más coincidencias dentro de estos cuatro programas. En los casos que en no hubo coincidencia se calificó como Indeterminado (ID). La asignación del alelo a la secuencias peptídica en estudio se definió “como el alelo que presenta una mayor afinidad”. Si ambos presentan el mismo tipo de unión, fue anotado como doble unión. Cuando el tipo de unión fue indeterminado para un alelo y el otro presentaba una unión baja o intermedia, no se asignó alelo. Los alelos estudiados fueron; donante DC10: DRB1*01:01/DRB1*11:04, donante DC31: DRB1*01:01/DRB1*07:01 y donante DC16: DRB1*09:01/DRB1*10:01.

Un 45,8% de las secuencias peptídicas encontradas se asignó a un alelo. En un 93% de los casos, se asignó a un alelo perteneciente al EC. De los alelos del EC estudiados, al alelo DRB1*01:01 le fueron asignados un 95% de las secuencias y al

alelo DRB1*10:01 el 5% restante. De los alelos no pertenecientes al EC, sólo un 7% de las secuencias le fueron asignadas, siendo el más frecuente el alelo DRB1*07:01, le sigue el alelo DRB1*09:01 y finalmente el alelo DRB1*11:04. Un 43,4% de los secuencias peptídica fueron consideradas de doble unión. Un 10,8 % de las secuencias no se pudo determinar el alelo, debido a que el tipo de unión de la secuencia peptídica al alelo fue indeterminada.

Al analizar el total de péptidos (Figura 21), vemos que casi un 48% de ellos presenta un tipo de unión de afinidad alta (AA), un 31% un tipo de afinidad baja (AB), un 5,4% presenta una unión de tipo intermedia (AI) y un 15,5% no se logró determinar el tipo de unión (ID). Cuando nos enfocamos por donantes, observamos que el donante DC31 presenta un 65,4% de unión AA y en este donante se observa un porcentaje menor (6,3%) de unión ID. Esto se debe a que los alelos de este donante están bien caracterizados en las herramientas bioinformáticas utilizadas en el análisis. Llama la atención el tipo de afinidad presentada por el donante DC16, en donde la mayoría de las secuencias encontradas presenta un tipo de unión AB alcanzando un 48,3%, y el tipo de uniones ID se alza sobre un 31%, y sólo se observa un 16% de uniones AA. Una posible explicación está dada porque el motivo de unión del alelo DRB1*10:01 aparece descrito sólo en un trabajo realizado el 2008 (Álvarez et al., 2010), a diferencia del alelo DRB1*01:01 para el que está muy bien caracterizado su motivo de unión. El donante DC10, presenta un 43,8% de unión AA, un 29,8% de unión AB, un 22,8% de uniones ID y sólo un 3,5% de uniones AI.

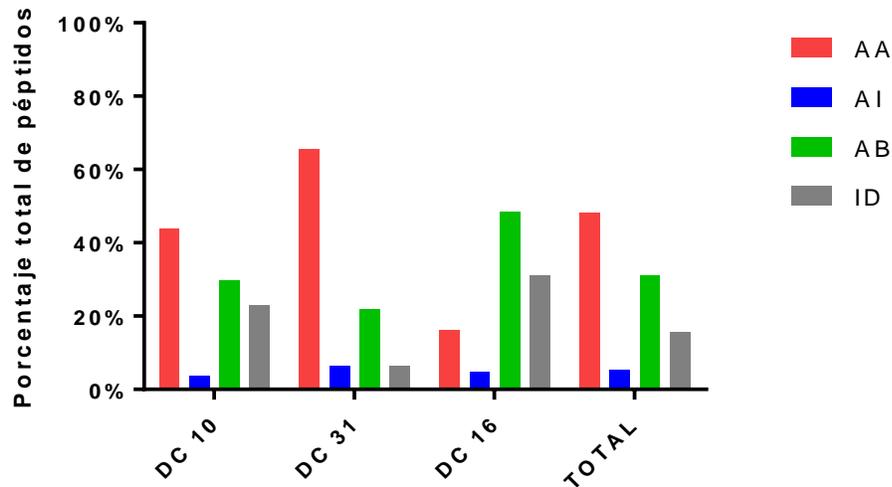


Figura 21. El peptidoma asociado a la molécula HLA-DR en CDs de donantes sanos que expresan alelos del EC presenta en su mayoría uniones de alta afinidad. Porcentaje de tipo de unión en las muestras de CDs. Cada barra representa el porcentaje de péptidos según afinidad de unión. Los péptidos fueron agrupados por grado de afinidad. El grado de afinidad se obtuvo mediante las herramientas bioinformáticas PROPRED, SYFPEITHY, EIDB *analyses resource* y Net MHCII pan 2.1, determinando 4 categorías: Afinidad alta (AA), intermedia (AI), baja (AB) e indeterminada (ID).

Nos enfocamos en el tipo de unión por alelo para estudiar de manera más profunda la influencia de los alelos que pertenecen al EC en el procesamiento y presentación antigénica (Figura 22). Al analizar el alelo DRB1*01:01, presente en los donantes DC31 y DC10, se observa que entre 60% y un 40,3% presenta unión AA, siendo este tipo de unión el principal en estos alelos. En el caso del donante DC16, hay un gran porcentaje de secuencias en que no se pudo determinar su tipo de unión debido a diferencias en los programas utilizados. Otro alelo del EC estudiado fue el alelo DRB1*10:01, que presenta un 47% de unión de tipo AI y un 42% de uniones

AB. Dentro de los alelos que no pertenecen al EC, destaca el alelo DRB1*09:01 que presenta un 66% de unión AB, y el alelo DRB1*11:04, que presenta un 36% de secuencias en donde no se pudo establecer el tipo de unión.

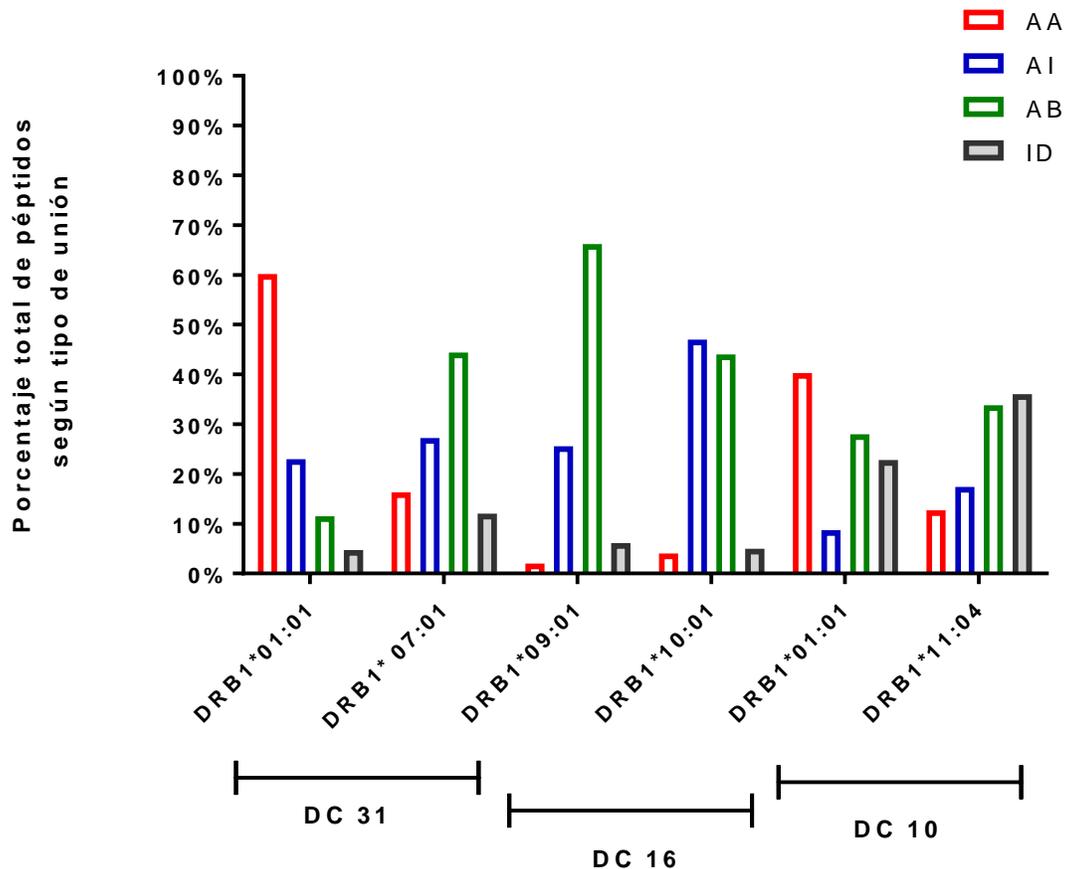


Figura 22. El alelo DRB1*01:01 presenta un mayor porcentaje de Afinidad en comparación a los demás alelos estudiados. Análisis predictivo de afinidad de unión de péptidos a HLA-DR en CDs pulsadas y no pulsadas con fluido sinovial. Cada barra representa el porcentaje del total de péptidos según afinidad de unión. Los péptidos fueron agrupados por alelos y grado de afinidad. El grado de afinidad se determinó en 4 categorías: Afinidad alta (AA), intermedia (AI), baja (AB) e indeterminada (ID).

En resumen se observa que el alelo DRB1* 01:01 presenta un tipo de unión AA a las secuencias peptídicas estudiadas y que esta es independiente del donante, ya que esta características se observaron en donantes cuyo alelos secundarios eran distintos.

Analizamos el tipo de unión en relación a la vía de degradación de la proteína parental en cada donante (Figura 23). El donante DC31 presenta un mayor porcentaje de uniones de alta afinidad, -alrededor de un 60% (Figura 21)-, y de ellas un 90% proviene de secuencias derivadas de proteínas de la vía endocítica. En este mismo donante observamos que presenta un 55% de unión AB proviene y estas estas secuencias provienen de proteínas de la vía citosólica. El donante DC10 (Figura 21) presenta un 43% de uniones AA y de ellas un 92% provienen de proteínas derivadas de la vía endocítica. En este donante se observa que un 100% de las secuencias de unión intermedia provienen de la vía endocítica. El donante DC16 presenta un porcentaje elevado de péptidos derivados de la vía endocítica (87%, Figura 21). En este donante se observa que independiente del tipo de unión, las proteínas derivadas de la vía endocítica predominan, pero podemos observar que hay un leve aumento de proteínas de la vía citosólica en la secuencias que presenta una unión más débil.

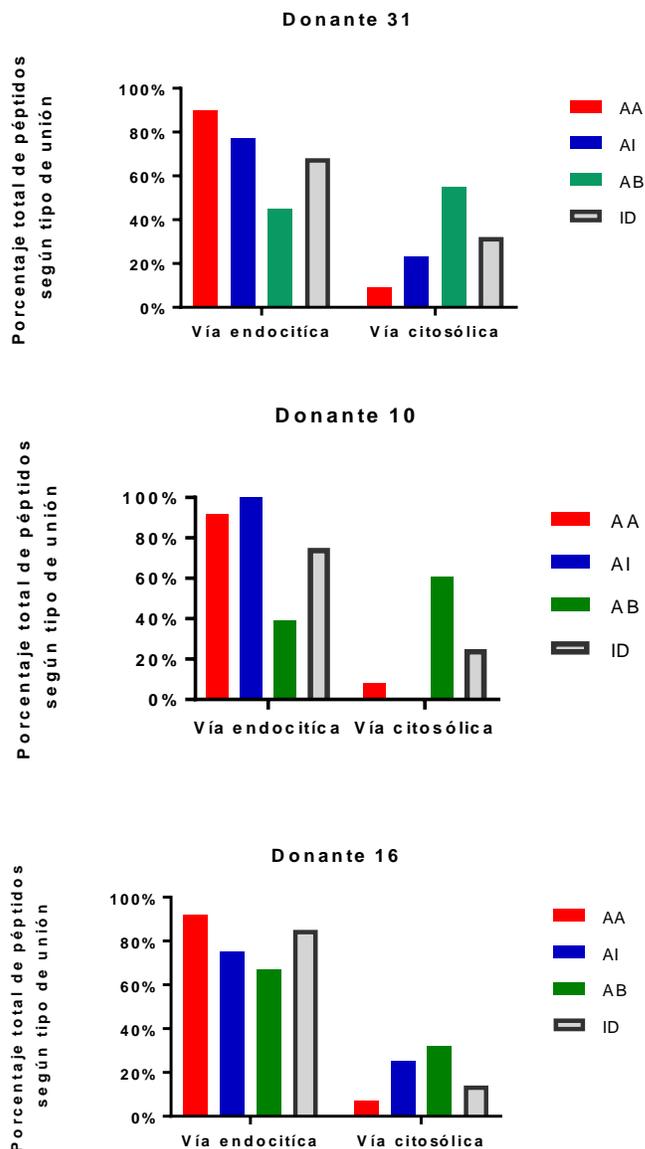


Figura 23. Las proteínas derivadas de vía endocítica presenta un mayor porcentaje de péptidos de AA y AI. Se agrupó según tipo de afinidad de cada donante y se subdividió según vía de degradación de la proteína parental. Cada barra presenta el porcentaje de tipo de unión del donante según vía de degradación.

Analizamos el tipo de unión presentado por las secuencias peptídicas al alelo y su distribución según compartimento celular y nos enfocamos en alelos del EC. En la figura 22 podemos observar que para el donante DC31, que presenta el alelo

DRB1*01:01, un 61% de las secuencias asignadas a este alelo presenta una unión AA. Si nos enfocamos en qué compartimento presenta el mayor porcentaje de secuencias AA (Figura 24), notamos que un 62% provienen de membrana, le siguen medio extracelular con un 13% y Endosoma/Lisosoma con un 12%. En este alelo las secuencias de unión de tipo intermedia están distribuidas entre citosol (34%), membrana (20%) y Endosoma/Lisosoma (16%). El alelo DRB1*10:01, expresado en el donante DC16, presenta un 47% de uniones AI (Figura 22) y estos péptidos provienen en un 50% de proteínas derivadas de membrana (Figura 24). En este mismo alelo vemos que las secuencias AB en un 70% provienen de membrana. El alelo DRB1*01:01 expresado por el donante DC10, presenta características similares en cuanto a la distribución del tipo de unión de las secuencias y la localización de ellas según compartimento celular que el donante DC 31. En él podemos observar que presenta 43,8% de uniones AA (Figura 22) y que ellas provienen en un 75% de proteínas procedentes de membrana (Figura 24). Este alelo presenta un 29,8% de secuencias de unión AB, las que se distribuyen principalmente entre proteínas provenientes del medio extracelular (31%) y membrana (25%). Las secuencias que presentaron unión (ID) en un 53,8% provenían de proteínas de membrana.

En conclusión, se observa que en la mayoría de los casos, los alelos que expresan moléculas del EC presentan secuencias peptídicas con unión de alta afinidad al motivo de la molécula MHC y que estas secuencias derivan de proteínas de la vía endocítica, -y principalmente del compartimento de membrana-, lo que guarda relación con la biología y función de la molécula MHC clase II.

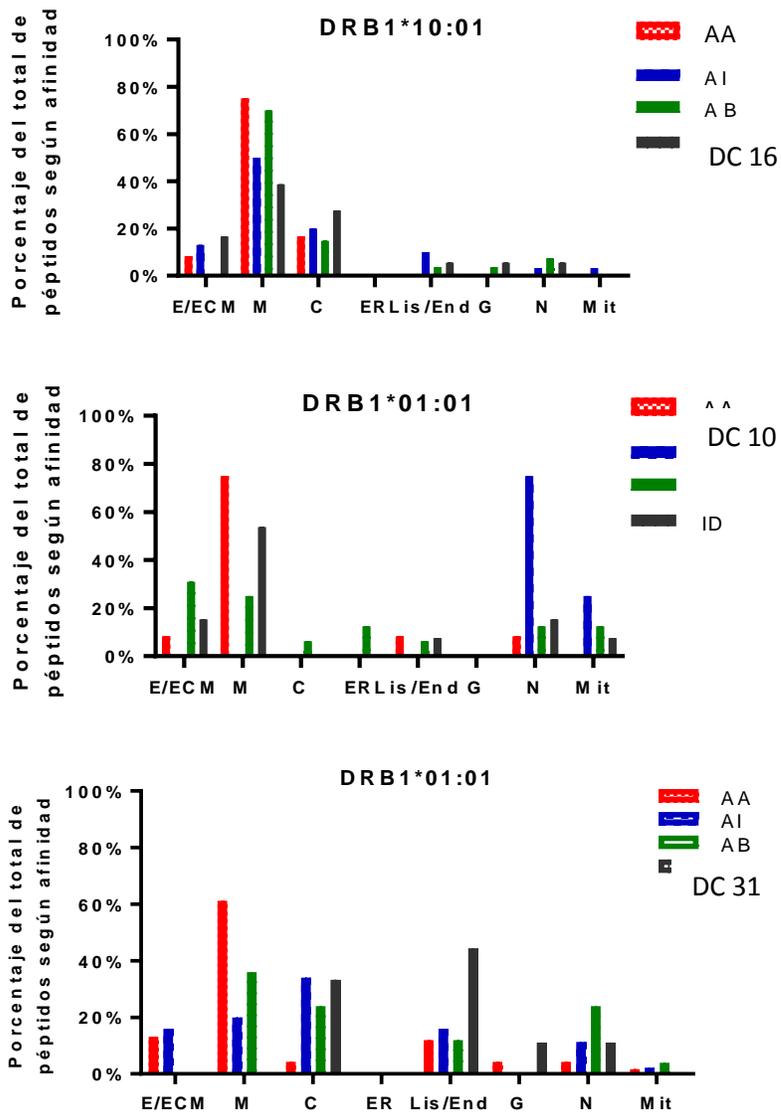


Figura 24. Las secuencias que presentan uniones de alta afinidad a alelos del EC provienen mayoritariamente de proteínas derivadas de membrana. Tipo de unión de las secuencias para cada alelo del EC según localización de las proteínas parentales de muestras CDs .Cada barra representa el porcentaje del total de péptidos según grado de afinidad teórica (AA, AI, AB e ID) para cada alelo, según la localización de la proteínas parentales.

Utilizamos la herramienta bioinformática DAVID y con la función *Functional Annotation Clustering*, identificamos qué procesos biológicos estaban enriquecidos desde nuestro grupo de proteínas parentales obtenidas. Como explicamos en las muestras de tejidos, se obtuvo un puntaje o *score* desde una base de datos a partir de un análisis sistémico (Huang et al 2009). Se tomaron en cuenta aquellos grupos que presentan un puntaje de enriquecimiento igual o superior a 2 tomando como umbral una exigencia alta (Tabla 16).

Tabla 16. En el peptidoma asociado a la molécula HLA-DR de CDs de donantes que expresan alelos EC hay un enriquecimiento en proteínas relacionadas con lisosoma y tráfico de vesículas.

Clúster funcional	Donante 31	Donante 10	Donante 16
Puntaje de enriquecimiento			
Lisosoma	7,93		3,36
Membrana citoplasmática unida a vesícula	4,21		3,18
Respuesta inmune	3,0	2,24	3,41
Respiración celular	2,7		
Transmembrana			2,99
Complejo MHC-I			3,1
Complejo MHC-II		4,03	
Unión disulfido		2,26	

En el peptidoma asociado a la molécula HLA-DR en dos donantes (DC31 y DC16), existe un enriquecimiento de proteínas relacionadas con lisosoma y tráfico de vesículas (Tabla 16). En los tres donantes se observan grupos relacionados con la respuesta inmune, que están compuestos por un variado número de proteínas involucradas en el procesamiento y presentación antigénica en moléculas MHC clase I y II. Los grupos formados a partir de las proteínas encontradas tienen estricta relación con el rol que cumple la CD y dan cuenta de procesos de autofagia, endocitosis y fagocitosis, en donde la CD internaliza los antígenos del medio. El grupo relacionado con la respuesta inmune está íntimamente ligado con el proceso de presentación antigénica.

Analizamos las proteínas parentales de las secuencias más abundantes encontradas en los tres donantes. En el caso de donante DC31, la aminopeptidasa, integrina alfa-M y la lipasa son las más abundantes. En el donante DC10, -en donde se obtuvo menos péptidos-, la cadena beta de la molécula HLA-DR fue la más frecuente. El donante DC16 presentó un alto porcentaje de proteínas de la molécula HLA-1, cadena alfa (Tabla 17).

Tabla 17. Proteínas parentales de las secuencias de péptidos asociados a HLA-DR, más abundantemente encontradas en las CDs de donantes sanos portadores del EC, cargadas con fluido sinovial (FS), o sin cargar y sólo maduras con LPS (LPS). En cada celda se indica el número de secuencias encontradas.

Proteínas	Donante 31		Donante 10		Donante 16	
	FS	LPS	FS	LPS	FS	LPS
Aminopetidasa	42	34				
Glutaredoxina-1	13	9				
Hemopexina	24	10				
Cadena alfa de la molécula HLA-DR	15	18				
Integrina alfa-M	42	39	6			
Lipasa proteína	24	25				
Sintenina-1	10	19				
Cadena alfa B-7 de la molécula HLA-1					94	37
Cadena alfa A- 68 de la molécula HLA-1					97	40
Cadena beta 1-DP de la molécula HLA-II			6			
Cadena beta 1-DP de la molécula HLA-II			10	10		

N: Es el número de secuencias peptídicas por proteínas

Luego nos enfocamos en qué proteínas podrían compartir tejido sinovial y CDs, y de manera indirecta poder asociar si hubo procesamiento del fluido sinovial por parte de las CDs (Tabla 18). El donante DC31 comparte el mismo haplotipo que

el paciente AR12, y ambos presentan la secuencia SPmYSIITPNILR de la fracción C3 del complemento, y en ambos casos esta secuencia tiene un tipo de unión de AA en ambos alelos. En el caso del donante DC10 que fue pulsado con fluido sinovial del paciente AR7, el análisis del peptidoma de las CDs y del tejido sinovial de este paciente, no compartieron proteínas ni secuencias comunes, aunque cabe señalar que ellos no presentan el mismo haplotipo y que el repertorio peptídico obtenido en ambos casos es mucho menor que para el donante DC31 y el paciente AR12.

Tabla 18. Proteínas parentales de péptidos asociados a HLA-DR comunes entre tejido sinovial de pacientes AR y CDs cargadas con fluido sinovial (FS) de pacientes AR. El número representa la cantidad de secuencias encontradas para esa proteína en cada condición

Proteínas	Tejidos			CDs	
	AR 12	AR16	AR7	DC+LPS+FS	DC+LPS
Actin, cytoplasmic 1	3			8	19
Complement C3	1	10		1	
Elongation factor 1-alpha 1	6				1
Fibronectin	1		2		
Filaggrin-2		1	1		
Histone H4	3				8

DISCUSIÓN

El desarrollo de los análisis mediante espectrometría de masas, ha permitido identificar péptidos -que están presentes en muchos fluidos biológicos que incluyen suero, órganos linfoides, plasma y orina (Li et.al, 2011, Meng et. al., 2007, Ling et. al, 2010)-, en la búsqueda de biomarcadores para seguimiento y monitoreo de enfermedades. La riqueza de la información de estos análisis nos revela los procesos metabólicos que son llevados a cabo en determinado órganos, tejidos y fluidos, permitiéndonos realizar una comparación más detallada de procesos fisiológicos y patológicos.

Este trabajo buscó realizar un análisis de los péptidos naturalmente presentados (NPPs), en el contexto de una enfermedad autoinmune, como lo es AR y enfocados en la influencia genética de los alelos del EC, en búsqueda de posibles candidatos de epítomos T para AR.

En AR, se integran una respuesta inmune adaptativa e innata, y se promueve el daño de la membrana sinovial, -lo que es catalizado por un *feedback* positivo mediado por interacciones entre leucocitos, fibroblastos, condrocitos y osteoclastos-, direccionando el daño a la cronicidad (Mc Innes et al, 2011). Los pacientes seleccionados para este trabajo, a la fecha de la extracción del tejido sinovial, presentaban una evolución de la enfermedad por sobre los 20 años, tiempo en el cual se acentúa la hiperplasia sinovial que lleva al daño del cartílago. La erosión del hueso, puede afectar al 80% de los pacientes dentro de un año después del diagnóstico (van der Heijde at al, 1995). Las pacientes AR7 y AR12 presentaban un

índice de actividad de la enfermedad (DAS) intermedio y alto al momento de la artroscopia de rodilla, respectivamente. Este *score* es un fiel reflejo de la condición global del paciente, ya que toma parámetros clínicos y de laboratorio para evaluar su condición. Las pacientes estaban sometidas a drogas anti-reumáticas (DMARDs) de primera línea, como metrotexato, y corticoides.

La expresión de la molécula de HLA-DR fue observada mediante western blot y microscopía de fluorescencia en el tejido sinovial de los pacientes con AR. Este hallazgo fue reportado por Klareskog en 1984, en muestra de articulación que presentaba la figura histológica de *pannus* (Klareskog et al, 1984). La expresión de la molécula MHC clase II por parte de APC profesionales, está regulada por el gen controlador transactivador de MHC clase II (CIITA) (Reith et al, 2005), que es expresado de manera constitutiva y puede ser incrementado por la presencia de IFN- γ (Steimle et al, 1994). IFN- γ está mediando un proceso pro-inflamatorio en la articulación de los pacientes con AR, lo que se ha visto en tejido sinovial, en donde se ha detectado la presencia de esta citoquina en conjunto con TNF e IL-17 (Nakajima A et al, 2016). Además, la expresión de la molécula HLA-DR puede estar presente en células como fibroblastos en la membrana sinovial en el contexto de tejido inflamado (Tran et al, 2007).

También, se estudió la presencia de proteínas citrulinadas en el tejido sinovial de pacientes con AR. Basándonos en el protocolo de Chang (Chang et al, 2009), pudimos observar citrulinación en el tejido por medio de microscopía de fluorescencia y en el fluido sinovial mediante western blot. A su vez se cuantificó los APCA en fluido sinovial. Todo esto se realizó para dar solidez a lo descrito en la introducción

sobre la importancia de la citrulinación en AR. Nuestros resultados están de acuerdo a la literatura en que se observa presencia de citrulinadas en tejido sinovial de pacientes AR (Chang et al, 2009). De las muestras de tejidos analizadas por espectrometría de masas (AR12, AR7 y AR16), no se realizó análisis de western blot ni microscopia de fluorescencia, por lo que no se puede chequear si estas muestras presentaban proteínas citrulinadas.

En el análisis de espectrometría de masas tanto de tejido como de CDs, no se observaron péptidos citrulinados. El análisis por espectrometría de masas para cuantificar péptidos citrulinados es complicado, ya que debido a la pérdida de la carga positiva del residuo arginina, el nuevo residuo citrulina tiene un incremento de sólo 1 Da en su masa, por lo que es difícil de distinguir. El incremento en sólo 1 Da puede no ser identificado por una base de datos sin péptidos citrulinados o puede ser considerada la presencia de otra MPT como la deaminación de glutamina o asparragina (de Ceuleneer et al, 2012, Sanne et al, 2014). Posible soluciones a este problema radican en búsqueda en bases de datos MS/MS con presencia de péptidos citrulinados y búsqueda manual en los espectros tanto de citrulinación como de deaminación simultáneas. También se pueden comparar los posibles péptidos citrulinados con un patrón previamente establecido (de Ceuleneer et al, 2012). Hao y su grupo, analizaron el espectro de disociación inducido por colisión en péptidos citrulinados y observó la pérdida de 43Da en péptidos citrulinados, lo que es debido a la eliminación del grupo ácido isocianico (HNCO) desde el grupo ureido de la citrulina, encontrando que esta característica permite diferenciar entre citrulinación y deaminación (Hao et al, 2009). También existen métodos en los cuales se realiza modificación química, con los agentes 2,3 butanediona y antipirina, de los residuos

citrulinados previo al análisis por espectrometría. Con este método se exhibe un incremento de 238 Da producto de la modificación, pero no permite identificar los sitios de citrulinación (Holm et al, 2006).

Los estudios de caracterización de péptidos asociados a la molécula HLA-DR, en un inicio comenzaron utilizando líneas celulares de linfoblastos B transformados por virus EBV, como fuente de complejo péptidos/HLA-DR. Esto llevo a la identificación de motivos estructurales alelo específicos comunes para péptidos que se asocian a determinados alelos HLA-DR y HLA-DQ. (Chisz et al, 1993, Rammsee et al, 1999). El estudio del repertorio de péptidos en líneas celulares, -como las de linfoblasto B-, muestra diferencias al comparar los péptidos obtenidos desde tejido, esto queda demostrado en el trabajo de Muntasell (Muntasell et al, 2002). El peptidoma asociado a la molécula HLA-DR en tejido, es una fotografía in situ a los procesos biológicos que se llevan a cabo en un tejido autoinmune. Los primeros trabajos datan de 1995, en donde se caracterizó 17 péptidos de bazo de un paciente con AR (Gordon et al, 1995). A la fecha, se han presentado varios trabajos que siguen la idea inicial de Gordon, -búsqueda in situ-. Cabe destacar el repertorio asociado a la molécula HLA-DR en tejido tiroideo de paciente con enfermedad de Graves (Muixi et al, 2008), el estudio comparativo entre tejido sinovial de paciente con AR y paciente con enfermedad de Lyme asociado al alelo DRB1*01:01 (Seward et al, 2011, 2013). Bajo esta misma premisa, se ha estudiado el peptidoma asociado a timo, buscando conocer las bases de la tolerancia central a través de los péptidos presentados en este tejido (Collado et al, 2013).

Dentro del repertorio de péptidos obtenidos en tejido sinovial, la mayoría posee un largo de 9 a 24 aa con un promedio total de 16 aa, lo que concuerda con el

peptidoma obtenido desde membrana sinovial de un paciente AR portador del alelo DRB1 01:01, en el trabajo que compara peptidoma de la molécula HLA-DR de pacientes con AR versus pacientes con enfermedad de Lyme (Seward et al, 2011). En cuanto a la procedencia de los péptidos obtenidos desde tejidos sinoviales, más de un 60% provienen de proteínas procesadas por la vía endocítica, lo que guarda relación con los resultados obtenidos en tejidos por diversos grupos, como timo (Collado et al, 2013) y tiroides (Muixí et al, 2008), aunque en tejido como cerebro de pacientes con esclerosis múltiple, se observa que la mayoría de los péptidos provienen de la vía citosólica (Fissolo et al, 2009), -lo que se repite en el caso de membrana sinovial en el estudio de Seward (Seward et al, 2011)-. El repertorio presentado por la molécula HLA-DR, está relacionado en parte con el mecanismo de captación de antígenos, ya sea por medio de macropinocitosis, endocitosis o fagocitosis de antígenos exógenos (Roche et al, 2015). Pero además las APC pueden presentar antígenos derivados de proteínas citoplasmáticas, lo que puede darse en el proceso de autofagia, el cual determina procesamiento antigénico por la vía endosomal de proteínas derivadas de citosol y lisosoma (Dengjel et al, 2005). Algunos autores rescatan la idea de que este tipo de procesamiento mediaría procesos de regulación a nivel de linfocitos T CD4+ (Dengjel et al, 2005). Estudios posteriores analizando peptidoma de la molécula HLA-DR en células B y CD8 humanas, describen que entre un 20% y un 30% de las secuencias derivan de proteínas de citosol y núcleo (Adamopoulou et al. 2013). En los tejidos estudiados en nuestro trabajo, un 70% de los péptidos deriva de proteínas que provienen del medio extracelular. El paciente AR12 es la excepción, ya que un 40% de su repertorio

proviene desde proteínas de membrana. En el caso del paciente AR7, casi un 40% proviene de citosol.

Por otra parte, se estudió el grado de afinidad de las secuencias encontradas con los respectivos alelos, con especial énfasis en los alelos pertenecientes al EC. El alelo DRB1*01:01 presenta un 60% de secuencias de afinidad alta. En el alelo DRB1*04:01, en cambio, un 63% de las secuencias presentó una unión de afinidad intermedia. En los alelos DRB1*03:01, DRB1*04:07 y DRB1*07:01, que no pertenecen al EC, presentaron en su mayoría secuencias de afinidad baja. La teoría del EC, descrita en 1987 por Gregersen (Gregersen et al, 1987), describe un motivo de secuencia compuesto por 3 aa homólogos y dos variantes que está codificado por determinados alelos (HLA-DRB1*04:01; HLA-DRB1*04:04, HLA-DRB1*01:01, HLA-DRB1*04:05, y HLA-DRB1*10:01). Esta secuencia, situada en la pared de la hélice alfa del bolsillo de unión al péptido de la cadena beta de la molécula HLA-DR, estaba altamente representada en pacientes con AR, lo que sugiere que podría influenciar la unión de péptidos artritogénicos a la molécula de HLA, y por tanto la presentación a linfocitos T CD4+. En el 2013, R. Thomas y su grupo logran asentar las bases moleculares en que se basa esta teoría. Ellos demostraron cómo péptidos citrulinados -caracterizados como auto-antígenos (derivados de vimentina)-, se unían al bolsillo de unión de moléculas positivas para el EC, y que el residuo P₄, de carga positiva en los alelos HLA-DRB1*04:01 o *04:04 contribuye a la unión del residuo citrulinado. Además, en este mismo trabajo se evidenció que la citrulinación altera el clivaje de la vimentina por la cathepsina L, generando péptidos neo-antigénicos que son presentados a linfocitos T CD4+ autorreactivos (Scally et al, 2013). Los resultados obtenidos por este grupo, permiten corroborar la asociación hecha entre

AR, péptidos citrulinados y HLA-DR. Nuestros resultados nos indican que estos alelos presentan una alta afinidad por las secuencias peptídicas presentadas en el peptidoma de tejido y CDs, independiente si éstas provienen de un autoantígeno citrulinado o autoantigénicos. La significación biológica de este hallazgo es muy importante, ya que una mayor estabilidad en la unión del péptido a la molécula MHC permitiría una mayor presentación de péptidos a los linfocitos T CD4+ autorreactivos.

La hendidura de unión en la molécula MHC II, está caracterizada por poseer un bolsillo hidrofóbico y por una red de uniones de puente de hidrógeno entre las cadenas laterales de la molécula MHC y la estructura del péptido (Nelson et al, 1999). La caracterización de la contribución energética de estas interacciones ha permitido el desarrollo de modelos predictivos. La interacción MHC-II-péptido ha sido históricamente interpretada como un bloque rígido, sin embargo este modelo ha cambiado debido a la evidencia del rol que juega la flexibilidad conformacional en la formación de estos complejos. Análisis termodinámicos de la unión, sugieren un modelo complejo de interacciones físico-químicas, donde la naturaleza del péptido determinaría el grado del ensamblaje del complejo MHC-II/péptido (Ferrante et al, 2013). En donde el co- factor HLA-DM juega un rol muy importante y es el contrapunto en la unión del péptido al motivo MHC. HLA-DM interactúa en la zona N-terminal del motivo y estabiliza la unión a la hendidura en un estado receptivo. Además, dirige el intercambio de péptido desde una cinética termodinámica. Un péptido que se une de manera estable a la hendidura puede competir contra HLA-DM e interactuar con los residuos HLA-DR. (Ferrante et al, 2013). Las aproximaciones teóricas mediante herramientas bioinformáticas deberían tener dentro de sus modelos la variante de la molécula HLA-DM.

La célula dendrítica (CD) es una eficiente célula presentadora de antígeno (APC). Esta célula en su estadio inmaduro internaliza material exógeno, ya sea por un proceso de macropinocitosis, por medio de un proceso de endocitosis mediada por receptor, como receptores Fc γ R y receptores de lectina o también mediante un proceso de fagocitosis. No sólo internaliza material exógeno, sino que mediante un proceso de autofagia internaliza cuerpos apoptóticos (Roche et al, 2015).

Ella es capaz de captar estos antígenos y activarse gracias a la presencia de señales de peligro exógenas o endógenas. Una vez activa y madura, deja de ser una célula que capta antígenos y pasar ser una célula presentadora de antígenos. La célula dendrítica madura moviliza a su superficie los complejos MHC-II/ péptidos e incrementa la estabilidad de la molécula MHC, para así promover el reconocimiento específico de éstos por parte de los linfocitos T CD4+ (Roche et al, 2015).

El estudio del repertorio peptídico asociado a la molécula HLA-DR ha permitido definir los motivos de unión alelo específico para las moléculas MHC clase (DP, DQ y DR) y así poder descubrir los mecanismos involucrados en el procesamiento y presentación antigénica. Como dijimos en el capítulo referente a las muestras de tejido, los primero trabajos comenzaron con células B inmortalizadas, para seguir con el estudio de tejido. La expresión variable del complejo MHC clase II/péptido en tejido, -que puede estar dada por APC profesionales o células propias del tejido que por modulación expresan moléculas MHC clase II (Muixi et al, 2008)-, hace que la cantidad de péptidos obtenidos entre muestra y muestra sea variable. En el año 2004, se aislaron más de 200 péptidos desde células dendríticas derivadas de monocitos (CD mo) y se analizó la influencia de la proteína li en el peptidoma

asociado a la molécula HLA-DR y cómo esta actuaría de antagonista en la polarización de los linfocitos Th1 (Röhn et al, 2004). Los trabajos de peptidoma asociado a la molécula HLA-DR desde CDs, a la fecha son muy pocos. Un estudio en CDs de timo permitió aislar un total de 155 péptidos no redundantes (Adamopoulou et al, 2013). La estrategia de Röhn y su equipo, ha sido utilizada para el estudio de la presentación antigénica del factor VIII en busca de regiones antigénicas (van Haren et al, 2011) y para el estudio de presentación antigénica en un haplotipo, -que confiere susceptibilidad a púrpura trombocitopénica (Sorvillo et al, 2013)-.

En nuestro trabajo utilizamos monocitos de donante sano, que expresan un alelo de susceptibilidad a AR para la obtención de CDs que fueron pulsadas con fluido sinovial de pacientes con AR. Esta estrategia se realizó por dos motivos; uno fue obtener una cantidad alta de complejo MHC clase II/péptido y la segunda, estudiar el procesamiento y presentación antigénica *in vitro* en moléculas HLA-DR que confieren susceptibilidad a AR.

A partir de PBMC de donante sano se generaron CDs, que presentaban un fenotipo maduro. Estas células presentaron un elevado grado de muerte celular y se observó disminución en la expresión de la molécula HLA-DR en el grupo de CDs pulsadas con fluido sinovial. Sallusto en 1994, genera por primera vez CD desde monocitos de sangre utilizando GM-CSF e IL-4, estas células presentaban características propias del linaje. (Sallusto et al, 1994). Nosotros nos basamos en este protocolo modificado (García et al, 2013) para obtener CDs, en el cual se reduce el tiempo de cultivo de 7 a 5 días y se reduce la cantidad de IL-4 en el medio de cultivo. Para la maduración de las células dendríticas utilizamos LPS, que provoca un

incremento en la expresión de las moléculas MHC-II y moléculas co-estimuladoras. Este efecto no se observa en las primeras 2 horas, pero si es evidente en las 24 horas siguientes (Van Niel et al, 2006). Además aumenta la estabilidad en la superficie celular de la molécula MHC-clase II y la CDs mantiene su capacidad para adquirir antígenos (Cella et al, 1997). La disminución en la expresión de las moléculas HLA-DR en la CD pulsadas con fluido sinovial, podría estar asociada a la presencia de moléculas inmunoreguladoras como IL-10, -abundante en fluido sinovial de pacientes con AR (Gómez- Puerta et al, 2013)-. IL-10 induce a la transcripción del mRNA de MARCH11o que causa niveles de expresión bajos en MHC II, CD86 y otras proteínas de activación en CDs maduras con LPS (Tse et al, 2011).

Son muy pocos trabajos los realizados en peptidoma derivado de CDs. Debido a la naturaleza de esta célula y su capacidad de primar a los linfocitos T CD4+ naive, es importante identificar los péptidos que son presentados en estas células y cómo son procesados, qué mecanismos propios de este tipo celular rigen la presentación de péptidos propios y cómo se genera tolerancia. La CDs presentan características especiales en relación a otras células APC, ya que son menos ácidas en los compartimentos lisosomales que los macrófagos y permiten preservar la integridad de los péptidos antigénicos, diferencia que está mediada por RAC2 asociada a NADPH oxidasa 2 (NOX2) (Savina et al, 2008).

En nuestro trabajo se observa una distribución normal de los péptidos presentados por CDs según tamaño, como un promedio de 16 aa. Un 86% de las secuencias encontradas provienen de la vía endocítica, en donde un 70% de las secuencias derivan de proteínas de membrana, mientras que un 14% proviene de la vía citosólica. En los primeros trabajos realizados en APC destaca una gran cantidad

de proteínas citosólica y secuencias que son expresadas en alta proporción, que hacen ruido en la búsqueda de péptidos más específicos (Muntasell et al, 2004). El avance tecnológico ha permitido una mayor selección de los péptidos encontrados por espectrometría de masas desde APC y así lograr un análisis comparativo del peptidoma de antígenos propios presentados. En estudios posteriores se ha logrado observar repertorio de péptidos derivados de proteínas de membrana, citoplasma y compartimiento extracelular, que está más acorde a nuestros resultados (Costantino et al, 2012, Bozzaco et al, 2011).

En estudios realizados en timo, en que se comparó el peptidoma de las CDs residentes en timo positivas para moléculas MHC clase I y II y todo el resto del timo, se destacó la presentación de antígenos nucleares y citosólicos en moléculas MHC clase II, como un mecanismo de inducción a la tolerancia central, dando un rol importante al proceso de autofagia (Adamopoulou et al, 2013).

En cuanto a las funciones biológicas que se encuentran representadas en el repertorio peptídico de las CDs, observamos que proteínas relacionadas con el lisosoma, respuesta inmune, complejo MHC clase II y I se ven enriquecidas con respecto al resto, lo que concuerda con lo descrito en el trabajo de Adamopoulou y MT Ciudad (MT Ciudad et al, 2016 Adamopoulou et al, 2013), en donde se observa enriquecimiento de proteínas del metabolismo celular, proliferación y relacionadas con la respuesta inmune (Adamopoulou et al, 2013).

Se estudió el tipo de afinidad en las secuencias obtenidas desde las CDs de donantes pulsadas y no pulsadas con fluido sinovial. Un 45,8% de las secuencias peptídicas encontradas se asignó a un alelo y en un 93% de los casos, se asignó a un alelo perteneciente al EC. De los alelos del EC estudiados, al alelo DRB1* 01:01

le fueron asignados un 95% de las secuencias y al alelo DRB1*10:01 el 5% restante. Es importante señalar, que los métodos utilizados para analizar el tipo de afinidad y promiscuidad de las secuencias, no toman en cuenta los residuos que flanquean el “core” o la estructura ternarias de unión las cuales afectan la unión en la molécula MHC.

Un 48 % de las secuencias encontradas presentan un tipo de unión de AA, un 31% un tipo AB, un 5,4% presenta una unión de tipo AI y un 15,5% no se logró determinar el tipo de unión (ID). Para el alelo DRB1*01:01 (donantes DC 31 y DC10), se observa entre un 60% y un 40,3% de uniones AA, mientras que el alelo DRB1*10:01 presenta un 47% de uniones AI. En consecuencia, en los alelos del EC, se observa que la mayoría de las secuencias peptídicas presenta un tipo de unión AA y que estas secuencias derivan de proteínas de la vía endocítica y principalmente del compartimento de membrana.

Al igual que en tejido, podemos ver independiente del alelo, que los alelos del EC presentan con mayor afinidad los péptidos. Otra característica importante es que la presentación antigénica es única para cada individuo, ya que aun compartiendo un mismo alelo los donantes DC31 y DC10, presentan diferencias en cuanto a tipo de afinidad y repertorio. En el trabajo de Costantino, los autores comparan el peptidoma asociado a APCs en antígenos tipo T y B, y encuentran casi un 90% de coincidencia, llamándolo “proteoma común”, pero al comparar con un donante con alelo diferente las mayoría de los péptidos fueron distintos, aunque provenían de una proteína común (Costantino et al, 2012).

La mayor afinidad con que los péptidos son presentados por moléculas del EC nos lleva a pensar, que en condiciones patológicas este tipo de presentación de

antígenos podría contribuir a activar a linfocitos T autorreactivos, promoviendo su diferenciación a células efectoras, así como al proceso de diversificación epitópica en AR, debido a que el proceso inmune llevaría a la exposición de epítopes crípticos que están presentes en citosol y núcleo, generando nuevos epítopes que amplifican el proceso inflamatorio. En el suero de un mismo paciente con AR se observan anticuerpos AACP dirigidos varios péptidos citrulinados, (Lunberg et al, 2013) demostrándonos este proceso de diversificación.

CONCLUSIONES

1. En tejido sinovial de pacientes AR, se observan secuencias peptídicas provenientes de proteínas de la respuesta inflamatoria. La distribución por tamaño de estas secuencias no es homogénea entre las muestras estudiadas, pero guarda relación con lo descrito para peptidoma presentado por la molécula HLA-DR. Estas secuencias provienen de la vía endocítica y de manera particular del compartimento extracelular.

2. De las secuencias asignadas a un sólo alelo encontradas en tejidos, en su mayoría fueron asignaron a alelos pertenecientes al EC. Estos alelos presentaron una AA e AI a las secuencias peptídicas.

3. En el peptidoma obtenido desde las CDs pulsadas y no pulsadas con fluido sinovial, se observó una distribución normal según tamaño de los péptidos encontrados. La mayoría de las secuencias encontradas provenían de proteínas de la vía endocítica, siendo el compartimento de membrana con mayor representación

4. De las secuencias peptídicas asignadas a un alelo, un 95% de ellas se asignó a un alelo perteneciente al EC.

5. En CDs que presentaban el alelo DRB1*01:01, se observa un alto porcentaje de uniones de afinidad alta.

6. No se observó citrulinación de las secuencias peptídicas encontradas en tejido ni en las CDs pulsadas y no pulsadas con fluido sinovial.

BIBLIOGRAFÍA

Adamapoulou E, Tenzer S, Hilén N, Klug P. “Exploring the MHC-peptide matrix of central tolerance in the human thymus”. *Nat. Commun.* Vol 4:2039. 2013.

Agrawal S, Misra R, Aggarwal A. “Autoantibodies in rheumatoid arthritis: association with severity of disease in established RA”. *Clin Rheumatol.* Vol 26: 201–204. 2007

Alvarez I, Collado J, Daura X, Colóné N. “The rheumatoid arthritis-associated allele HLA-DR10 (DRB1*10:01) shares part of its repertoire with HLA-DR1 (DRB1*01:01) and HLA-DR4 (DRB*04:01). *Arthritis Rheum.* Vol 58(6). 1630-1639. 2010.

Arnett F, Edworthy S, Bloch D, McShane D, Fries J, Cooper N. “The American rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis”. *Arthritis and Rheumatism.* Vol 31. No 3. 315-322.1988

Barton, A. “Genetic susceptibility to rheumatoid arthritis: an emerging picture”. *Arthritis and Rheumatism.* Vol 61: 1441-1446. 2009

Bax M. “Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned?” *Immunogenetics* Vol 63:459–466. 2011.

Bhayani, H.R. and Hedrick, S.M. “The role of polymorphic amino acids of the MHC molecule in the selection of the T cell repertoire” *E. J. Immunol.* Vol 146: 1093–1098. 2001.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL. “Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *J. Immunol.* Vol 174(1) 6-19. 2005.

Bozzacco L, Yu H, Zebroski HA, Dengjel J, Steinman RM.”Mass spectrometry analysis and quantification of peptides presented on the MHC II molecules of mouse spleen dendritic cells”. *J. Proteome Res.* Vol 10. 5016-5030. 2011.

Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Strominger JL. “Three dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1”. *Nature.* Vol 364(6432) 33-39. 1993.

Burkhardt H. “Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis”. *Eur J Immunol.* Vol 35:1643–1652. 2005.

Catrina A, Ytterberg J, Malmoström V, Klareskog L. "Lungs, joints and immunity against citrullinated proteins in rheumatoid arthritis" *Nature reviews in Rheumatology*. Vol 10. 645-653. 2014

Cella M, Engering A, Pinet V. "Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC classII complexes on dendritic cells". *Nature*. Vol 388. 782-787. 1997.

Chang X, Jian X, Yan X. "Expression and citrullination of keratin in synovial tissue of rheumatoid arthritis" *Rheumatic. Int*. Vol 29. 1337-1342. 2009.

Charles Janeway, Paul Travers, Mark Walport "Janeway's "Immunobiology 8th edition" Chapter 4: Antigen recognition by B-cell and T-cell receptor, Chapter 6: Antigen presentation to T lymphocytes. Garland Sciences. 2012.

Chicz R, Urban R, Gorga J, Vignali A, Lane W. "Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles". *J. Exp. Med*. Vol 178. 27-47. 1993.

Ciudad MT, Sorvillo N, van Alphen F, Catalán D, Jaraquemada D. "Analysis of the HLA-DR peptidome from human dendritic cells reveals high affinity repertoires and nonconventional pathways of peptide generation". *J Leuk. Biol*. jlb.6HI0216-069R; doi:10.1189/jlb.6HI0216-069R. 2016.

Collado J, Alvarez I, Ciudad MT, Espinoza G, Jaraquemada D. "Composition of the HLA-DR-associated human thymus peptidome". *Eur. J. Immunol*. Vol 43. 2275-2282. 2013.

Costantino CM, Spooner E, Ploegh H, Hafler DA. "Class II MHC self-antigen presentation in human B and T lymphocytes". *Plos One*. Vol 7. 29805.2012.

De Almeida D. "New insights into the functional role of the rheumatoid arthritis shared epitope". *FEBS Letters*. Vol 585: 3619–362. 2011.

De Ceuleneer M, Van Steendam K, Dhaenens M, Elewaut P." Quantification of citrullination by means of skewed isotope distribution pattern". *J. of Proteome research*".

Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M. "Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins". *PNAS*. Vol 102. 7922-7927. 2005.

Dennis G, Holweg C, Kummerfeld SK, Choy DF, Townsend MJ, Hackney JA. "Synovial phenotypes in rheumatoid arthritis correlate with response to biologic therapeutics". *Arthritis research and therapy*. Vol 16:R90 1-18. 2014.

Ding B, Padyukov L, Lunström E, Seielstad M, Plengue RM."Different patterns of associations with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody- negative rheumatoid arthritis in the extended major histocompatibility complex region". *Arthritis Rheum*. Vol 60 (1). 30-38. 2009

Engelhard V. " Post-translational modifications of naturally processed MHC-binding epitopes". *Curr. Opinion in Immunology* Vol 18: 92-97. 2006

Ferrante. A. "Thermodynamics of peptide-MHC class II interactions: not all complexes are created equal". *Frontiers in Immunology*. Vol 5. (388). 1-6. 2013.

Fissolo N, Haág S, de Graáf K, Drews O, Stevanovic S, Rammensee H."Naturally presented peptides on major histocompatibility complex I and II molecules eluted from central nervous system of multiple sclerosis patients". *Molecular and cellular Proteomics*. Vol 8. 2090-2101.2009

Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maát C. "T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines". *J. Exp. Med*. Vol 183 (6). 2593-2603. 1996.

Fujimoto M, Serada S, Mihara M, Uchiyama Y, Yoshida H. "Interleukin-6 blockade suppresses autoimmune arthritis in mice by the inhibition of inflammatory Th17 responses". *Arthritis Rheum*. Vol 58 (12) 3710-3719. 2008

García-González P, Morales R, Hoyos L. " A short protocol using dexamethasone and monophosphoryl lipid A generates tolerogenic dendritic cells that display a potent migratory capacity to lymphoid chemokines". *J. of Translational Medicine*. Vol 11:128. 1-15. 2013.

Gómez-Puerta J, Cells R, Hernández MV, Ruiz-Esqüide V, Ramírez J, Haro I. "Differences in synovial fluid cytokine levels but not in synovial tissue cell infiltrate between anti-citrullinated peptide/protein antibody-positive and negative rheumatoid arthritis patients". *Arthritis research and therapy*. Vol 15. 2013.

Gordon R, Young JA, Rayner S, Luke R. "Purification and characterization of endogenous peptides extracted from HLA-DR isolated from the spleen of a patient with rheumatoid arthritis". *Eur. J. Immunol*. Vol 25. 1473. 1995.

Goronzy JJ, Weyand CM. "Rheumatoid arthritis". *Immunol Rev.* Vol 204: 55-73. 2005

Gregersen, P.K. "The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis". *Arthritis Rheum.* Vol 30, 1205–1213. 1987

Guía Clínica artritis reumatoidea. Serie guías clínicas MINSAL N°52. 2007.

Gyorgy B, Toth E, Tarcsa E, Falus A, Buzas EI. "Citrullination: a posttranslational modification in health and disease". *Int. J Biochen Cell.* Vol 38. 1662-1677. 2006

Hao G, Wang D, Gu J, Gross S, Wang Y. "Neutral loss of isocyanic acid in peptide CID spectra a novel diagnostic marker for mass spectrometric identification of protein citrullination" *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* Vol20. 723-727. 2009

Hermansson M. "MS analysis of rheumatoid arthritic synovial tissue identifies specific citrullination sites on fibrinogen". *Proteomics Clin. Appl.* Vol 4. 511–518. 2010.

Hill JA. "Cutting edge: the conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule". *J. Immunol.* Vol 171:538–541. 2003.

Hill JA. "Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice". *J Exp Med.* Vol 205:967–979. 2008

Holm A, Rise F, Sessler N, Sollid L, Undheim K, Fleckenstein B. "Specific modification of peptide-bound citrulline residues". *Anal. Biochem.* Vol 352. 68-76. 2006.

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources". *Nature Protoc.* Vol. 4(1):44-57. 2009.

Imboden JB. "The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis". *Annu Rev Pathol* Vol 4:417–434. 2009

Kinloch A, Lundberg K., Wait R, Wegner N, Lim NH." Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis". *Arthritis Rheum.* Vol 58 (8). 2287-2295. 2008

Kinloch A. " Identification of citrullinated α -enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis". *Arthritis Research & Therapy*. Vol 7: 1421-1429. 2005.

Klareskog L, Johnell O, Hulth A. "Expression of HLA-DR and HLA-DQ antigens on cells within the cartilage-pannus junction in rheumatoid arthritis". *Rheumatol. Int.* Vol 4. Suppl:11-5. 1984.

La Cava, A. " Genetic bias in immune responses to a cassette shared by different microorganisms in patients with rheumatoid arthritis". *J. Clin. Invest.* Vol 100: 658–663. 1997.

Lampson L. and Levy R. Two populations of Ia-like molecules on human B cell line. 1980. *Journal of Immunology*. 125: 293-299

Lee DM, Weinblatt ME. "Rheumatoid arthritis". *Lancet*. Vol 358 (9285): 903-911. 2001.

Liao W, Li Z, Wang H, Wang J, Fu Y. "Proteomic analysis of synovial fluid: insight into the pathogenesis of knee osteoarthritis" *International Orthopaedics*. Vol 37. 1045-1053. 2013

Li Y, Dang T., Shen J, Hicks. "Plasma proteome predicts chemotherapy response in osteosarcoma patients" *Oncol Resp*. Vol 25. 303-314. 2011.

Ling X, Lau K, Deshpande C, Park JL. "Urine proteomic and targeted plasma protein analyses in the diagnosis and monitoring of Lsystemic juvenile idiopathic arthritis". *Clin. Proteomics* Vol 6, 175-193. 2010

Lubberts Erick. "The IL-23-IL 17 axis in inflammatory arthritis". *Nature Reviews Rheumatology*. Vol 11. 415-430. 2015

Lugli, E. " Expression of citrulline and homo citrulline residues in the lungs of non-smokers and smokers: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis" *Arthritis Research & Therapy* .Vol 17:9. 2015.

Lundberg K, Bengtsson C, Kharlamova N, Reed E, Jiang Xia. "Genetic and environmental determinants for disease risk in subsets of rheumatoid arthritis defined by the anticitrullinated protein/peptide antibody fine specificity profile". *Ann Rheum Dis*. Vol 72. 652-658. 2013.

Lundegaard C, Lund O, Nielsen M. " Prediction of epitopes using neural network based methods". *Journal Immunol Methods*. Vol 374. 26-34. 2011

MacGregor AJ. "Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins". *Arthritis Rheum* Vol. 43:30–37. 2000

Matéos J. "Differential protein profiling of synovial fluid from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients using LC–MALDI TOF/TOF". *Journal of proteomics*. Vol 5, 286 – 2878. 2012

Mathsson L, Lampa J, Mullazehi M, RÖnnelid J. "Immune complexes from rheumatoid arthritis synovial fluid induces FC γ RIIa dependent and rheumatoid factor correlated production of tumour necrosis factor-alpha by peripheral blood mononuclear cells". *Arthritis Research and Therapy*. Vol (3). R64. 2006

McInnes Ian, Schett G. "The pathogenesis of rheumatoid arthritis". *N. ENGL. J. MED.* Vol 354: 23. 2205-2219. 2011.

Meng Z, Veenstra T.D. "Proteomics analysis of serum, plasma and lymph for identification of biomarkers". *Proteomics Clin. Appl.* Vol1. 747-757. 2007

Monach P. "Abroad screen for targets of immune complexes decorating arthritic joints highlights deposition of nucleosomes in rheumatoid arthritis". *PNAS*. Vol. 106 .37 15867–15872. 2009.

Mor A, Abramson SB, Pillinger MH. "The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction". *Clin Immunol* Vol 115: 118-125. 2005

Moran EM, Mullan R, McCormick J, Connolly M, Sullivan O, Fitzgerald O. "Human rheumatoid arthritis tissue production of IL-17A drives matrix and cartilage degradation: synergy with tumour necrosis factor-alpha, Oncostatin M and response to biologic therapies". *Arthritis Res Ther*. Vol(4) R113. 2009

Muixí L. "Thyroglobulin Peptides Associate In Vivo to HLA-DR in Autoimmune Thyroid Glands". *J. of Immunol.* Vol 181: 795-807. 2008.

Muixí, L. "Peptides presented in vivo by HLA-DR in thyroid autoimmunity "Advances in Immunology. Chapter 6. 165-209. 2008

Muntasell A, Carrascal M, Serradell L, van Veelen P, Verreck F. "HLA-DR4 molecules in neuroendocrine epithelial cells associate to a heterogeneous repertoire of cytoplasmic and surface self peptides". *J. of Immunology*. Vol 169: 5052-5060. 2002.

Murphy C, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, Mc Clanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD. "Divergent pro- and anti-inflammatory roles for il-23 and il-12 in joint autoimmune inflammation". *J Exp. Medicine*. Vol. 198. 1951–1958. 2003.

Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y." Suppression of immune induction of collageninduced arthritis in iL-17-deficient mice". *J. Immunol*. Vol 171. 6173–6177. 2003

Nakajima A, Aoki Y, Sonobe M, Watanabe F. "Relative expression and correlation of tumor necrosis factor α , interferon- γ and interleukin-17 in the rheumatoid synovium". *Clin Rheumatol*. Apr 1. 2016.

Neefjes J, Jongsma M, Paul P, Bakke O. "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC classII antigen presentation". *Nature Reviews in Immunology*. Vol 11. 823-636. 2011

Nelson CA, Fremont DH. "Structural principles of MHC class II antigen presentation". *Rev Immunogenet*. Vol 1(1). 47-59. 1999.

Notley CA, Ehrenstein MR. "The yin and yang of regulatory T cells and inflammation in RA".. *Nature reviews in rheumatology*. Vol 6 (10). 572-577. 2010.

Oshitani N. "Analysis of intestinal HLA-DR bound peptides and dysregulated immune responses to enteric flora in the pathogenesis of inflammatory bowel disease". *Int. J. Mol. Med* Vol11, 99-104. 2003.

Padyukov,L. " A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. Vol 50; 3085-3092. 2004.

Raijmakers R, van Beers J, El-Azzouny M, Visser N, Bozic B. "Elevated levels of fibrinogen-derived endogenous citrullinated peptides in synovial fluid of rheumatoid arthritis patients". *Arthritis Research and Therapy*. Vol 14: 1-10. 2012

Rammensee, H. "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs". *Immunogenetics*. Vol 50: 213-219. 1999.

Rantapaá-Dahlqvist. "Antibodies against cyclic citrullinatedpeptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis". *Arthritis Rheum* Vol 48:2741–2749. 2003

Reith W, Leibundgut, Waldurger JM. "Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator". *Nature reviews in Immunology*. Vol 5. 793-806.2005

Roche PA, Futera K. "The ins and outs of MHC II-mediated antigen processing and presentation". *Nat. Rev. Immunol.* Vol 15(4). 203-216. 2015

Röhn TA, Boes M, Wolters D, Spindeldreher S. Upregulation of the CLIP self peptide on mature dendritic cells antagonizes T helper type 1 polarization. *Nat Immunol.* Vol5 (9). 909-918.2004

Sallusto F, Lanzavecchia A. "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α ". *J.Exp. Med.* Vol 179. 1109-1118. 1994.

Sanne M, Hensen M, Pruijn M. "Methods for the detection of peptidylarginine deiminase (PAD) activity and protein citrullination". *Molecular and Cellular proteomics*". Vol13.2. 388-396.2014. Vol.11. 5241-5255. 2012.

Sato W, Aranami T, Yamamura T. "Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5- phenotype" *J. Immunology*. Vol 178(12) 7525-7529. 2007

Savina A. "The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalinisation and antigen crosspresentation selectively in CD8+ dendritic cells". *Immunity* Vol 30. 544-555. 2008.

Scally T. "A molecular basis for association of the HLA-DRB1 locus, citrullination, and rheumatoid arthritis". *J. Exp. Med.* Vol.210 N°12 2569-2582. 2013

Schellekens GA. "The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide". *Arthritis Rheum.* Vol 43:155–163. 2000

Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. "Rheumatoid arthritis". *Lancet.* Vol. 376: 1094–1108. 2010.

Seldin MF. "The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis". *Arthritis Rheum* Vol 42:1071–1079.1999

Seward R, Drouin E, Klemen S, Costello C. "A novel human autoantigen. Endothelial cell growth factor, is a target of T and B cell responses in patients with Lyme disease". *Arthritis Rheum.* Vol 65 (1). 186-196. 2013.

Seward RJ." Peptides presented by HLA-DR molecules in synovia of patients with rheumatoid arthritis or antibiotic- refractory Lyme arthritis". Mol Cell Proteomics Vol. 10 (3) 1-14. 2011

Shen H, Goodall JC, Hill Gaston JS. "Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis" Arthritis Rheum. Vol 60 (6): 1647-1656. 2009

Shmerling R, Delbanco T, Tosteson A, Trentham D. " Synovial fluid test what should be ordered? The Journal of the American Medical Association. Vol 264, No. 8. 1990.

Singh H, Raghava G. ProPred 1: prediction of promiscuous MHC Class-I binding sites. Bioinformatics. Vol 19 (8). 1009. 2001.

Sinz A. " Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactive arthritis or osteoarthritis" . Electrophoresis. Vol 23, 3445–3456. 2002

Sorvillo N, van Haren SD, Kaijen PH, Brinke A. " A preferential HLA-DRB1*11-dependet presentation of CUB2-derived peptides by ADAMTS13-pulsed dendritic cells. Blood. Vol 121(17). 3502-3510. 2013.

Soumya Raychaudhuri. " Five amino acids in the three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis". Nature genetics. Vol 44 issue 3; 291-298. 2012

Steimle V, Siegrist C, Mottet A. "Regulation of MHC class II expression by interferon γ mediated by the transactivator gene CIITA". Science. Vol 265, 106-109. 1994.

Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stromminger JL. "Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide". Nature Vol 17(6488) 215-221. 1994

Sturniolo T, Bono E. "Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices. Nature Biotechnology. Vol 17. 555. 1999.

Suri A, Lovitch S, Unanue E. "The wide diversity and complexity of peptides bound to class II MHC molecules". Current opinion in immunology. Vol 18. 70-77. 2006.

Syversen SW. "High anti-cyclic citrullinated peptide levels and an algorithm of four variables predict radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis: results from a 10-year longitudinal study" . *Ann Rheum Dis*. Vol 67:212–217. 2008

Tak PP, Bresnihan B. "The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: advances from synovial biopsy and tissue analysis" *Arthritis Rheum*. Vol 43:2619-2933. 2000.

Taylor, PC, Feldmann M. "Anti- TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis". *Nat. Rev. Rheumatol*. Vol 5, 578-582. 2009.

Too, C. "Smoking interacts with HLA-DRB1 shared epitope in the development of anti-citrullinated protein antibody positive rheumatoid arthritis; results from the Malaysian Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis (MyEIRA)". *Arthritis Res. Ther*. 14. 2012.

Tran C., Davis M, Tesmer L, Endres J, Motyl C, Smuda C." Presentation of arthritogenic peptide to antigen-specific T cells by fibroblast-like synoviocytes". *Arthritis and rheumatism*. Vol 56.(5). 1497-1506. 2007.

Tze L, Horikawa K, Domaschewitz H, Howard D, Roots C. "CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation". *J. Exp. Med*. Vol 208(1). 149-165. 2011.

Uysal H, Nandakumar K, Kessel C, Haag S, Carlsen S. "Antibodies to citrullinated proteins: molecular interactions and arthritogenicity". *Immunological Reviews* Vol 233. 9-33. 2010.

Van der Heijde DM, van Leeuwen MA, van Riel PL. "Radiographic progression on radiographs of hands and feet during the first 3 years of rheumatoid arthritis measured according to Sharp's method (van der Heijde modification)". *The J. of rheumatology*. Vol 22 (9). 1792-1796. 1995

Van der Helm, van Mil AH. "An independent role of protective HLA class II alleles in rheumatoid arthritis severity and susceptibility". *Arthritis Rheum* Vol 52: 2637-2644. 2005.

Van Haren."HLA-DR presented peptide-repertoires derived from human monocyte-derived dendritic cells pulsed with blood coagulation factor VIII". *Mol Cell Proteomics*. Jun; 10 (6). 2011.

Van Niel G, Wubbolts R, ten Broeke T, Buschow S, Ossendorp F. "Dendritic cells regulate exposure of MHC class II at their plasma membrane by oligoubiquitination". *Immunity*. Vol 25. 885-894. 2006.

Van Steebergen HW." Association of Valine and Leucine at HLA-DRB1 Position 11 With Radiographic Progression in Rheumatoid Arthritis, Independent of the Shared Epitope Alleles but Not Independent of Anti-Citrullinated Protein Antibodies". *Arthritis Rheumatol*. Vol 67(4):877-886. 2015.

Van Steendam K. " Citrullinated vimentin as an important antigen in immune complexes from synovial fluid of rheumatoid arthritis patients with antibodies against citrullinated proteins". *Arthritis Research & Therapy* Vol 12:R132. 2010.

Wahlström, J. "Identification of HLA-DR-bound peptides presented by human bronchoalveolar lavage cells in sarcoidosis". *J. Clin. Invest.* Vol 117: 3576-3582. 2007.

Wang P, Sidney J, Kim Y, Sette A, Lund O, Nielsen M. "Peptide binding predictions for HLA-DR, DP and DQ molecules" *BMC Bioinformatics*. Vol.11: 586. 1-12.2010

Wegner N, Lundberg K, Kinloch A, Fisher B, Malmström V, Feldmann M. "Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis" *Immunological Reviews*. Vol 233: 32-54. 2010.

Wucherpfennig, K.W. "Selective binding of self peptides to disease-associated major histocompatibility complex (MHC) molecules: a mechanism for MHC-linked susceptibility to human autoimmune diseases". *J. Exp.Med.* Vol 181, 1597–1601. 1991.

Zhao L, Jiang Z, Jiang Y, Ma N, Zhang Y, Feng L. "IL-22 CD4+T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. Vol 16 (5) 518-526. 2013.

ANEXO 1. Péptidos asociados a moléculas HLA-DR en tejido sinovial de pacientes AR

Muestra	Número de Acceso ¹	Proteína	Masa ²	Secuencia	Longitud ³	Localización subcelular	Core		Tipo de afinidad alelo 1 ⁴	Tipo de afinidad alelo 2 ⁴	Alelo asignado	Promiscuidad ⁵
									DRB1*01:01	DRB1*07:01		
AR12	P60709	Actin, cytoplasmic 1	1,1E+08	DLYANTVLSGGTTmYPGIADR	21	C	LYANTVLSG	VLSGGTTMY	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/ DRB1*07:01	13*51
AR12	P60709	Actin, cytoplasmic 1	7,5E+07	LDFEQEmATAASS	14	C	FEQEMATAA	FEQEMATAA	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	1*51
AR12	P27797	Calreticulin	7,5E+07	GGGYKLFPSNLDQ	14	R. E.	YVKLFPSNL	YVKLFPSNL	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/ DRB1*07:01	30*51
AR12	P01024	Complement C3	7,6E+07	SPmYSIITPNILR	13	E/ECM	YSIITPNIL	YSIITPNIL	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/ DRB1*07:01	24*51
AR12	P02741	C-reactive protein	5,7E+07	SDTSYVSLKAPLTKPL	16	E/ECM	YVSLKAPLT	LKAPLTKPL	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	17*51
AR12	P68104	Elongation factor 1-alpha 1	5,3E+07	IEKFEKEAAEmGKG	14	N	FEKEAAEMG	IEKFEKEAA	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/ DRB1*07:01	0*51
AR12	P02751	Fibronectin	8,0E+07	APSNLRFLLATTPNSL	15	E/ECM	LRFLATTPN	FLATTPNSL	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/ DRB1*07:01	36*51
AR12	P62805	Histone H4	6,6E+07	TVTAmDVVYALK	12	N	VTAMDVVYA	VTAMDVVYA	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	7*51
AR12	P01766	Ig heavy chain V-III region BRO	8,4E+07	NTLYLNmNSLRAED	14	E/ECM	YLNmNSLRA	YLNmNSLRA	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	40*51
AR12	P01766	Ig heavy chain V-III region BRO	8,3E+07	TLYLNmNSLRAEDT	14	E/ECM	YLNmNSLRA	YLNmNSLRA	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	40*51
AR12	P01764	Ig heavy chain V-III region VH26	6,4E+07	KNTLYLQmNSLRAEDT	16	M	YLQmNSLRA	YLQmNSLRA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	40*51
AR12	P01764	Ig heavy chain V-III region VH26	8,3E+07	NTLYLQmNSLRAED	14	M	YLQmNSLRA	YLQmNSLRA	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	40*51
AR12	P01764	Ig heavy chain V-III region VH26	8,9E+07	NTLYLQmNSLRAEDT	15	M	YLQmNSLRA	YLQmNSLRA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	40*51
AR12	P01764	Ig heavy chain V-III region VH26	8,4E+07	TLYLQmNSLRAEDT	14	M	YLQmNSLRA	YLQmNSLRA	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	40*51
AR12	Q6W4X9	Mucin-6	6,3E+07	ILIRIARASQD	11	E/ECM	IRIARASQD	IRIARASQD	ALTA	DETERMINADA	DRB1*01:01	40*51
AR12	Q8IX21	Protein FAM178A	5,0E+07	NLSNVENGHLsrKRSSSD	18	E/ECM	LSNVENGHL	LSNVENGHL	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*01:01/ DRB1*07:01	0*51
AR12	Q8WZ42	Titin	6,4E+07	SRVPIPTmPIR	11	C	VPIPTPIR	VPIPTPIR	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/ DRB1*07:01	0*51
									DRB1*03:01	DRB1*14:01		
AR16	P05089	Arginase-1	6,9E+07	EVNPSLGKTPPEEVRTVNT	19	C	VNPSLGKTP	VNPSLGKTP	BAJA	No det	No det	0*51
AR16	P05089	Arginase-1	8,3E+07	INTPLTTTSGNLHGQP	16	C	INTPLTTTS	INTPLTTTS	BAJA	No det	No det	4*51
AR16	P05089	Arginase-1	9,2E+07	INTPLTTTSGNLHGQPVS	18	C	INTPLTTTS	INTPLTTTS	BAJA	No det	No det	4*51
AR16	P05089	Arginase-1	5,0E+07	IVKNPRSVGKASEQ	14	C	IVKNPRSVG	IVKNPRSVG	BAJA	No det	No det	11*51
AR16	O00299	Chloride intracellular channel protein 1	8,3E+07	FSAYIKNSNPALNDN	15	N	IKNSNPALN	IKNSNPALN	INTERMEDIA	No det	No det	7*51
AR16	P02745	Complement C1q subcomponent subunit A	5,9E+07	SIVSSSRGQVR	11	E/ECM	IVSSSRGQV	IVSSSRGQV	BAJA	No det	No det	6*51
AR16	P01024	Complement C3	7,8E+07	SGSDmVQAERSGIPI	15	E/ECM	MVQAERSGI	MVQAERSGI	BAJA	No det	No det	18*51
AR16	P01024	Complement C3	8,3E+07	SGSDmVQAERSGIPIV	16	E/ECM	MVQAERSGI	MVQAERSGI	BAJA	No det	No det	18*51
AR16	P01024	Complement C3	8,8E+07	SGSDmVQAERSGIPIVT	17	E/ECM	MVQAERSGI	MVQAERSGI	BAJA	No det	No det	18*51
AR16	Q5D862	Filaggrin-2	7,1E+07	PVLKNPDDPDTVD	13	C	LKNPDDPDT	VLKNPDDPD	BAJA	No det	No det	0*51
AR16	Q6NZI2	Polymerase I and transcript release factor	9,7E+07	IVERPLPGYPDAEPEPS	18	M	IVERPLPGY	IVERPLPGY	BAJA	No det	No det	0*51
AR16	A6NMY6	Putative annexin A2-like protein	6,0E+07	SLEGDHSTPPSA	12	E/ECM	LEGDHSTPP	LEGDHSTPP	BAJA	No det	No det	0*51
AR16	P02787	Serotransferrin	5,9E+07	VEKGDVAFVKHQTVPQ	16	E/ECM	FVKHQTVPQ	FVKHQTVPQ	BAJA	No det	No det	33*51
AR16	P02787	Serotransferrin	6,3E+07	VEKGDVAFVKHQTVPQN	17	E/ECM	VKHQTVPQN	FVKHQTVPQ	BAJA	No det	No det	33*51
AR16	P05543	Thyroxine-binding globulin	9,4E+07	DSSFLIDKTTTVQVPm	17	E/ECM	FLIDKTTTV	FLIDKTTTV	ALTA	No det	No det	17*51
									DRB1*04:01	DRB1*04:07		
AR7	P02679	Fibrinogen gamma chain	7,1E+07	GGTYSKASTPNGYD	14	E/ECM	YSKASTPNG	YSKASTPNG	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*04:01/ DRB1*04:07	0*51
AR7	P02679	Fibrinogen gamma chain	7,7E+07	GGTYSKASTPNGYDN	15	E/ECM	YSKASTPNG	YSKASTPNG	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*04:01/ DRB1*04:07	0*51
AR7	P02679	Fibrinogen gamma chain	7,9E+07	GGTYSKASTPNGYDNG	16	E/ECM	YSKASTPNG	YSKASTPNG	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*04:01/ DRB1*04:07	0*51
AR7	P02679	Fibrinogen gamma chain	8,3E+07	QGGTYSKASTPNGYDN	16	E/ECM	YSKASTPNG	YSKASTPNG	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*04:01/ DRB1*04:07	0*51

AR7	P02679	Fibrinogen gamma chain	9,1E+07	YQGGTYSKASTPNGYDN	17	E/ECM	YSKASTPNG	YSKASTPNG	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*04:01/ DRB1*04:07	0*51
AR7	P02679	Fibrinogen gamma chain	9,4E+07	YQGGTYSKASTPNGYDNG	18	E/ECM	YSKASTPNG	YSKASTPNG	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*04:01/ DRB1*04:07	0*51
AR7	P02751	Fibronectin	8,8E+07	GPMKEINLAPDSSSVVV	17	E/ECM	INLAPDSSS	INLAPDSSS	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*04:01	2*51
AR7	P02751	Fibronectin	8,7E+07	GPMKEINLAPDSSSVVV	17	E/ECM	INLAPDSSS	INLAPDSSS	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*04:01	2*51
AR7	Q5D862	Filaggrin-2	7,1E+07	PVLKNPDDPDTVD	13	C	VLKNPDDPD	VLKNPDDPD	BAJA	BAJA	DRB1*04:01/ DRB1*04:07	0*51
AR7	P69905	Hemoglobin subunit alpha	6,6E+07	VLSPADKTNVCAA	13	C	LSPADKTNV	LSPADKTNV	BAJA	BAJA	DRB1*04:01/ DRB1*04:07	0*51
AR7	P68871	Hemoglobin subunit beta	6,1E+07	DEVGGEALGRLL	12	C	VGGEALGRL	VGGEALGRL	BAJA	BAJA	DRB1*04:01/ DRB1*04:07	0*51
AR7	P68871	Hemoglobin subunit beta	5,2E+07	SDGLAHLNLLKGTFA	15	C	LAHLNLLKG	LAHLNLLKG	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*04:01	5*51
AR7	Q8NAA5	Leucine-rich repeat-containing protein FAM211A	3,6E+07	LQLLPALSTLPRLL	13	C	LQLLPALST	LQLLPALST	DETERMINAD	BAJA	DRB1*04:01/ DRB1*04:07	25*51
AR7	P11137	Microtubule-associated protein 2	1,0E+08	PDKMAEAPPSEAMTLPKDA	19	C	MAEAPPSEA	MAEAPPSEA	BAJA	BAJA	DRB1*04:01/ DRB1*04:07	0*51
AR7	O14544	Suppressor of cytokine signaling 6	7,0E+07	AFPEDESQVDQDLVVAPEI	19	C	FPEDESQVD	FPEDESQVD	BAJA	BAJA	DRB1*04:01/ DRB1*04:07	0*51

1. Número de acceso Unitprot; 2. Masa de la secuencia peptídica, 3.Tamaño del péptido en número de aminoácidos; 4. Afinidad teórica; 5. Promiscuidad teórica por propred

Anexo 2. HLA-DR de donantes

Código donante	RUT	DR1	DR4	DR10
CS1	22.904.312-9	negativo	negativo	negativo
CS2	22.692.636-4	negativo	negativo	negativo
CS3	13.508.656-8	positivo	positivo	negativo
CS4	15.825.350-k	negativo	positivo	negativo
CS5	17.175.749-5	negativo	negativo	negativo
CS6	15.080.899-5	negativo	negativo	negativo
CS7	14.509.254-k	negativo	positivo	
CS8	15.937.084-4	negativo	negativo	negativo
CS9	7.715.663-1	negativo	negativo	negativo
CS10	16.367.497-1	positivo	negativo	negativo
CS11	13.904.231-k	negativo	negativo	negativo
CS12	13.903.770-7	positivo	negativo	negativo
CS13	13.460.492-1	negativo	positivo	negativo
CS14	14.571.705-1	negativo	positivo	
CS15	11.477.913-k	negativo	positivo	negativo
CS16	14.637.822-6	negativo	negativo	positivo
CS17	10.427.616-4	negativo	negativo	
CS18	8.122.025-5	negativo	negativo	negativo
CS19	17.060.291-9	negativo	negativo	negativo
CS20	8.660.990-8	positivo	negativo	negativo
CS21	21.240.204-4	negativo	positivo	negativo
CS22	6.865.378-9	negativo	positivo	negativo
CS23	17.677.141-0	negativo	positivo	negativo
CS24	8.871.436-9			
CS25	8.220.597-7	negativo	negativo	negativo
CS26	10.154.775-2	negativo	positivo	negativo
CS27	7.353.073-3	negativo	negativo	negativo
CS28	15.840.434-6	positivo	negativo	negativo
CS29	9.745.046-3	negativo	negativo	negativo
CS30	16.072.253-3	positivo	positivo	negativo
CS31	17.101.644-4	positivo		
CS32	16.358.558-8	negativo	negativo	negativo
CS33	16.096.956-3	negativo	positivo	negativo
CS34	17.134.034-9			positivo
CS35	10.687.329-1	positivo	negativo	negativo
CS36	17.166.160-9	negativo	positivo	negativo
CS37	15.109.896-7	negativo	negativo	negativo
CS38	15.785.688-k	negativo	negativo	negativo
CS39	12.213.396-6	negativo	negativo	negativo
CS40	15.638.042-3	negativo	positivo	negativo
CS41	14.623.561-1	negativo	negativo	negativo
CS42	9.978.874-7	negativo	positivo	negativo
CS43	8.519.534-4	negativo	positivo	negativo
CS44	7.211.965-7	negativo	negativo	negativo

CS45	15.668.567-4	negativo	positivo	negativo
CS46	15.842.903-9	negativo	positivo	negativo
CS47	21.627.901-8	positivo	negativo	negativo
CS48	4.507.961-9	negativo	positivo	negativo
CS49	5.899.311-5	negativo	negativo	negativo
CS50	15.382.112-7	negativo	negativo	negativo
CS51	18.303.232-1	negativo	negativo	negativo
CS52	15.590.828-9	negativo	negativo	negativo
CS53	23.757.227-0	negativo	negativo	negativo
CS54	21.356.895-7	negativo	negativo	negativo
CS55	14.215.465-k	negativo	negativo	negativo
CS56	17.583.779-5	positivo	negativo	negativo
CS57	17.400.512-5	negativo	negativo	negativo
CS58	12.315.484-3	negativo	negativo	negativo
CS59	16.956.393-4	negativo	positivo	negativo
CS60	14.500.702-K	negativo	negativo	negativo
CS61	13.239.329-K	negativo	positivo	negativo
CS62	12.855.762-8	negativo	negativo	negativo
CS63	15.932.099-5	negativo		
CS64	12.167.276-6	negativo	negativo	negativo
CS65	15.563.421-9	negativo	positivo	negativo
CS66	15.599.530-0	negativo	negativo	negativo
CS67	17.375.477-9	negativo	negativo	negativo
CS68	7.250.305-8	negativo	positivo	negativo
CS69	17.314.533-0	negativo	positivo	negativo
CS70	17.130.988-3	negativo	negativo	negativo
CS71	23.278.556-k	positivo	negativo	negativo
CS72	10.953.262-2	negativo	positivo	negativo
CS73	18.165.175-k	negativo	positivo	negativo
CS74	15.786.251-0	negativo	negativo	negativo
CS75	16.750.926-6	negativo	positivo	negativo
CS76	17.310.298-4	negativo	negativo	negativo
CS77	18.126.527-1	negativo	positivo	negativo
CS78	12.627.726-1	negativo	negativo	negativo
CS79	6.590.479-9	positivo	negativo	negativo
CS80	9.034.510-4	negativo	negativo	positivo
CS81	10.984.727-5	negativo	positivo	negativo
CS82	13.483.414-5	negativo	negativo	negativo
CS83	21.254.840-5	negativo	negativo	negativo
CS84	12.356.990-3	negativo	negativo	negativo
CS85	15.330.491-2	negativo	negativo	negativo
CS86	12.644.155-K	positivo	negativo	negativo
CS87	8.516.510-0	negativo	positivo	negativo
CS88	17.024.955-0	negativo	negativo	negativo
CS89	22.350.518-K	positivo	negativo	negativo
CS90	15.933.190-3	negativo	negativo	negativo
CS91	14.696.805-8	negativo	positivo	negativo

CS92	9.155.638-3	negativo	positivo	negativo
CS93	16.238.022-2	negativo	negativo	negativo
CS94	19.201.403-4	negativo	negativo	negativo
CS95	15.931.226-7	negativo	negativo	negativo
CS96	17.259.374-2	negativo	positivo	negativo
CS97	13.570.841-2	negativo	negativo	negativo
CS98	10.647.496-6	negativo	positivo	negativo
CS101	18.019.543-2	positivo		

Anexo 3. Péptidos asociados a la molécula HLA-DR desde células dendríticas de donantes EC pulsadas con FS de paciente AR

Muestra	Número de Acceso ¹	Proteína	Masa ²	Secuencia	Longitud ³	Localización subcelular	Core	Tipo de afinidad		Alelo asignado	Promiscuidad ⁵	
								alelo 1 ⁴	alelo 2 ⁴			
DC 31 FS	P60709	Actin, cytoplasmic 1	7,39E+07	DFEQEMATAASSSS	14	C	FEQEMATAA	MATAASSSS	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	4*51
DC 31 FS	P60709	Actin, cytoplasmic 1	7,52E+07	LDFEQEMATAASSS	14	C	FEQEMATAA	FEQEMATAA	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	1*51
DC 31 FS	P60709	Actin, cytoplasmic 1	7,52E+07	LDFEQEMATAASSS	14	C	FEQEMATAA	FEQEMATAA	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	1*51
DC 31 FS	P60709	Actin, cytoplasmic 1	7,87E+07	LDFEQEMATAASSSS	15	C	FEQEMATAA	MATAASSSS	INDETERMINADA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	5*51
DC 31 FS	P60709	Actin, cytoplasmic 1	8,96E+07	SYELPDGQVITIGNER	16	C	YELPDGQVI	YELPDGQVI	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	0*51
DC 31 FS	P60709	Actin, cytoplasmic 1	8,37E+07	VALDFEQEMATAASSS	16	C	FEQEMATAA	FEQEMATAA	INDETERMINADA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	1*51
DC 31 FS	P01023	Alpha-2-macroglobulin	9,14E+07	GKPQYmLVPSLLHTE	16	E/ECM	YmLVPSLL	MVLPVPSLLH	ALTA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	44*51
DC 31 FS	P15144	Aminopeptidase N	6,04E+07	IINDAFNLASAHKVPVT	17	M	FNLASAHKV	FNLASAHKV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	19*51
DC 31 FS	P15144	Aminopeptidase N	7,98E+07	INDAFNLASAHKVPV	15	M	FNLASAHKV	FNLASAHKV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	13*51
DC 31 FS	P15144	Aminopeptidase N	5,66E+07	INDAFNLASAHKVPVT	16	M	FNLASAHKV	FNLASAHKV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	13*51
DC 31 FS	Q9UBR2	Cathepsin Z	1,03E+08	GNDLSVVDYAHQHGPIDE	18	End/Lis	YAHQHGPID	WDYAHQHGI	INTERMEDIA	INDETERMINADA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	0*51
DC 31 FS	Q9UBR2	Cathepsin Z	9,98E+07	NDLVVDYAHQHGPIDE	17	End/Lis	YAHQHGPID	WDYAHQHGI	INTERMEDIA	INDETERMINADA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	0*51
DC 31 FS	P11717	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	1,08E+08	DLNPLIKLSGAYLVDDSDPD	20	End/Lis	LIKLSGAYL	IKLSGAYLV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	34*51
DC 31 FS	Q9NZ23	Charged multivesicular body protein 5	9,38E+07	AQSFNMEQANYTIQS	16	End/Lis	FNMEQANYT	FNMEQANYT	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	5*51
DC 31 FS	Q9Y3Y2	Chromatin target of PRMT1 protein	6,86E+07	AYmAQTDPETND	12	N	YmAQTDPET	MAQTDPETN	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	0*51
DC 31 FS	P09496	Clathrin light chain A	1,11E+08	AILDGGGAPGPQHPGPPGPDVAVD	24	M	ILDGGAPGP	ILDGGAPGP	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	0*51
DC 31 FS	P09496	Clathrin light chain A	1,01E+08	GvMNGEYQESNGPTDSY	18	M	YQESNGPT	VMNGEYQOE	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	0*51
DC 31 FS	P01024	Complement C3	7,61E+07	SPmYSIITPNILR	13	E/ECM	YSIITPNIL	YSIITPNIL	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	24*51
DC 31 FS	P06396	Gelsolin	5,83E+07	TGDAYVILKTVQLRNG	16	C	YVILKTVQL	YVILKTVQL	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	51*51
DC 31 FS	P35754	Glutaredoxin-1	6,20E+07	IQDYQLQLTGARTVPR	16	C	LQQLTGART	LTGARTVPR	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	6*51
DC 31 FS	P02790	Hemopexin	7,91E+07	SDVEKLNAAKALPQP	15	E/ECM	VEKLNAAKA	LNAAKALPQ	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	7*51
DC 31 FS	P02790	Hemopexin	8,55E+07	SDVEKLNAAKALPQP	16	E/ECM	VEKLNAAKA	LNAAKALPQ	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	7*51
DC 31 FS	P02790	Hemopexin	8,72E+07	YSDEKLNAAKALPQP	16	E/ECM	VEKLNAAKA	LNAAKALPQ	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	7*51
DC 31 FS	P02790	Hemopexin	6,25E+07	YSDEKLNAAKALPQP	17	E/ECM	VEKLNAAKA	LNAAKALPQ	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	7*51
DC 31 FS	P10314	HLA class I histocompatibility antigen, A-32 alpha chain	8,18E+07	GDGTFQKWASVWVPSG	16	M	FKWASVWV	FKWASVWV	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	6*51
DC 31 FS	P30499	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-1 alpha chain	8,34E+07	GDGTFQKWAAVMPVPSG	16	M	FKWAAVMV	FKWAAVMV	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	3*51
DC 31 FS	P04233	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain	9,16E+07	mATPLLmQALPmGALPQ	17	M	LMQALPMGA	MQALPMGAL	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	22*51
DC 31 FS	P04233	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain	9,08E+07	MATPLLmQALPmGALPQ	17	M	LMQALPMGA	MQALPMGAL	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	22*51
DC 31 FS	P04233	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain	9,44E+07	mATPLLmQALPmGALPQG	18	M	LMQALPMGA	MQALPMGAL	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	22*51
DC 31 FS	P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	7,99E+07	AQGALANIAVDKANLE	16	M	LANIAVDKA	LANIAVDKA	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	0*51
DC 31 FS	P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	7,99E+07	EAQGALANIAVDKANL	16	M	LANIAVDKA	LANIAVDKA	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	0*51
DC 31 FS	P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	6,55E+07	IKEEHVIAQE	11	M	IKEEHVIQ	IKEEHVIQ	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	2*51
DC 31 FS	P04229	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-1 beta chain	5,12E+07	VGVEYRAVTE	9	M	VGVEYRAVTE	VGVEYRAVTE	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	No analizada
DC 31 FS	Q13349	Integrin alpha-D	8,45E+07	DTSVYSLPGQEAfM	15	M	YSLPGQEA	YSLPGQEA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	1*51
DC 31 FS	Q13349	Integrin alpha-D	6,16E+07	DTSVYSLPGQEAfM	16	M	YSLPGQEA	YSLPGQEA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	1*51
DC 31 FS	P11215	Integrin alpha-M	8,04E+07	DTSVFTLLPGQGAfVR	15	M	FLLPGQGA	FLLPGQGA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	2*51
DC 31 FS	P11215	Integrin alpha-M	8,30E+07	FGQSVVQLQGSRRVVVG	16	M	VVQLQGSRV	VQLQGSRVV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	28*51
DC 31 FS	P11215	Integrin alpha-M	9,79E+07	FGQSVVQLQGSRRVVVGAPQ	19	M	VVQLQGSRV	VQLQGSRVV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	27*51
DC 31 FS	P11215	Integrin alpha-M	8,59E+07	FGQSVVQLQGSRRVVVG	17	M	VVQLQGSRV	VQLQGSRVV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	27*51
DC 31 FS	P11215	Integrin alpha-M	1,01E+08	FGQSVVQLQGSRRVVVGAPQ	20	M	VVQLQGSRV	VQLQGSRVV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	27*51
DC 31 FS	P11215	Integrin alpha-M	7,57E+07	QGSVVQLQGSRRVVVG	15	M	VVQLQGSRV	VQLQGSRVV	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	24*51
DC 31 FS	P11215	Integrin alpha-M	8,61E+07	NDSVFTLLPGQGAfVR	16	M	FLLPGQGA	FLLPGQGA	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	2*51
DC 31 FS	P11215	Integrin alpha-M	7,28E+07	QSVVQLQGSRRVVVG	14	M	VVQLQGSRV	VQLQGSRVV	ALTA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	24*51
DC 31 FS	P11215	Integrin alpha-M	8,86E+07	TPLSAFNGLRPVLAEADA	17	M	FGNLRPVL	LRPVLAEADA	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	21*51
DC 31 FS	P11215	Integrin alpha-M	9,50E+07	TPLSAFNGLRPVLAEADAQ	18	M	FGNLRPVL	LRPVLAEADA	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	21*51
DC 31 FS	P05107	Integrin beta-2	6,34E+07	AGPNIAIVGGTVAG	15	M	IAIVGGTV	IAIVGGTV	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	0*51
DC 31 FS	P05107	Integrin beta-2	8,75E+07	NSNQFQTEVKGQLISG	16	M	FQTEVKGQL	FQTEVKGQL	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	2*51
DC 31 FS	P05107	Integrin beta-2	9,32E+07	NSNQFQTEVKGQLISGN	17	M	FQTEVKGQL	FQTEVKGQL	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	2*51
DC 31 FS	Q8N370	Large neutral amino acids transporter small subunit 4	8,00E+07	YPSTQFQSLTGLQLS	15	M	FGSLTGLQS	YPSTQFQSL	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	18*51
DC 31 FS	Q8N370	Large neutral amino acids transporter small subunit 4	9,00E+07	YPSTQFQSLTGLQLS	17	M	FGSLTGLQS	YPSTQFQSL	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	18*51
DC 31 FS	Q8NHJ6	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 4	6,59E+07	APQDVTYQALHSFTLRQ	17	M	YALHSFTL	YALHSFTL	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	5*51
DC 31 FS	Q99732	Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor	8,38E+07	AVNSYPTPPAPmPQP	16	End/Lis	YPTPPAPM	YPTPPAPM	INDETERMINADA	ALTA	DRB1*07:01	7*51
DC 31 FS	P06858	Lipoprotein lipase	6,89E+07	AGYTKLVGQDVAR	13	M	YTKLVGQDV	YTKLVGQDV	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	1*51
DC 31 FS	P06858	Lipoprotein lipase	6,55E+07	SAGYTKLVGQDVA	13	M	YTKLVGQDV	YTKLVGQDV	ALTA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	1*51
DC 31 FS	P06858	Lipoprotein lipase	4,89E+07	SAGYTKLVGQDVAR	14	M	YTKLVGQDV	YTKLVGQDV	ALTA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	1*51
DC 31 FS	P06858	Lipoprotein lipase	6,09E+07	YPSAGYTKLVGQDVAR	17	M	YTKLVGQDV	YTKLVGQDV	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	3*51
DC 31 FS	O75074	Low-density lipoprotein receptor-related protein 3	8,61E+07	APPSYGQLIAQGLIPPV	17	M	YGQLIAQGL	YGQLIAQGL	ALTA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	6*51
DC 31 FS	P38571	Lysosomal acid lipase/cholesterol ester hydrolase	7,34E+07	IKmFFALGPVASVA	14	End/Lis	FFALGPVAS	IKMFFALGP	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	37*51
DC 31 FS	Q9UQV4	Lysosome-associated membrane glycoprotein 3	5,76E+07	VGAYLTVSDPE	11	End/Lis	VGAYLTVSD	VGAYLTVSD	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	5*51
DC 31 FS	P22897	Macrophage mannose receptor 1	6,41E+07	FIISQLGYEPN	11	End/Lis	IISQLGYEP	FIISQLGYE	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	4*51
DC 31 FS	P15586	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	5,74E+07	FmmlIATPAPH	10	End/Lis	FMMIATPAP	FMMIATPAP	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	44*51
DC 31 FS	P15586	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	6,18E+07	FmmlIATPAPH	11	End/Lis	FMMIATPAP	FMMIATPAP	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	44*51

DC 31 FS	P15586	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	6.66E+07	FmmIATPAPHSP	12	End/Lis	FMMIATPAP	FMMIATPAP	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	44*51
DC 31 FS	O00483	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	6.36E+07	VFIGTGATGATLY	13	Mit	FIGTGATGA	FIGTGATGA	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	3*51
DC 31 FS	Q9BTU6	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	8.97E+07	LNQGYLSEAGASLVQDK	17	G	YLSEAGASL	YLSEAGASL	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	1*51
DC 31 FS	Q9BTU6	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	7.76E+07	NQGYLSEAGASLVQDK	15	G	YLSEAGASL	YLSEAGASL	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	1*51
DC 31 FS	P16671	Platelet glycoprotein 4	8.34E+07	YRDFPLSLVPPYVT	14	M	FLSLVPPYV	FLSLVPPYV	ALTA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	
DC 31 FS	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor	7.70E+07	SVDSGSSEEQGGSSRA	16	M	VDSGSSEEQ	VDSGSSEEQ	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	0*51
DC 31 FS	P01833	Polymeric immunoglobulin receptor	7.27E+07	VDSGSSEEQGGSSRA	15	M	VDSGSSEEQ	VDSGSSEEQ	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	0*51
DC 31 FS	P07602	Proactivator polypeptide	5.27E+07	ALVEHVKEE	9	End/Lis	ALVEHVKEE	ALVEHVKEE	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	No analizada
DC 31 FS	O75629	Protein CREG1	6.27E+07	FYLSPLQLSVS	11	E/ECM	FYLSPLQLS	FYLSPLQLS	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	15*51
DC 31 FS	O75629	Protein CREG1	5.44E+07	LATISTLEAVRGRPF	15	E/ECM	ISTLEAVRG	LATISTLEA	INTERMEDIA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	18*51
DC 31 FS	O75629	Protein CREG1	8.51E+07	LATISTLEAVRGRPFA	16	E/ECM	ISTLEAVRG	LATISTLEA	INTERMEDIA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	18*51
DC 31 FS	P51148	Ras-related protein Rab-5C	7.84E+07	SPNIVIALAGNKADLA	16	End/Lis	VIALAGNKA	IVIALAGNK	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	20*51
DC 31 FS	P02768	Serum albumin	5.18E+07	LGEYKFNALLVR	13	E/ECM	YKFNALLV	YKFNALLV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	19*51
DC 31 FS	P23246	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	8.98E+07	VFLLTTPRVVVEPL	16	N	VFLLTTPR	LLTTTPRV	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	15*51
DC 31 FS	O00560	Syntenin-1	9.72E+07	VDKVIQAQAFSANPANPA	19	M	IQAQTAFSA	IQAQTAFSA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	34*51
DC 31 FS	P13686	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5	6.68E+07	LGDNFYFTGVQDINDKR	17	End/Lis	FYFTGVQDI	FYFTGVQDI	INTERMEDIA	ALTA	DRB1*07.01	12*51
DC 31 FS	Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	7.94E+07	IDKVISTITNIQQ	14	E/ECM	VISTITNNI	VISTITNNI	INTERMEDIA	ALTA	DRB1*07.01	11*51
DC 31 FS	Q9Y310	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	5.13E+07	AAFDMNDPE	9	N	AAFDMNDPE	AAFDMNDPE	BAJA	INDETERMINADA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	No analizada
DC 31 FS	Q68CL5	Tubulin polyglutamylase complex subunit 2	3.63E+07	NKIVPKKGPVQ	13	C	IVPKKGP	IVPKKGP	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	18*51
DC 31 FS	P01375	Tumor necrosis factor	7.75E+07	GVFQLEKGDRLSAE	14	M	FQLEKGDRL	FQLEKGDRL	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	7*51
DC 31 FS	P01375	Tumor necrosis factor	5.74E+07	LGGVFLQLEKGDRLSAE	16	M	FQLEKGDRL	FQLEKGDRL	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	12*51
DC 31 FS	P27449	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit	6.47E+07	ASFFAVmGASAAm	13	M	FAVMGASAA	FAVMGASAA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	7*51
DC 31 FS	P27449	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit	6.96E+07	ASFFAVmGASAAmV	14	M	FAVMGASAA	VMGASAAmV	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	7*51
DC 31 FS	P27449	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit	5.68E+07	FFAVmGASAAm	11	M	FAVMGASAA	FAVMGASAA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	7*51
DC 31 FS	P27449	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit	7.28E+07	YASFFAVmGASAAm	14	M	FAVMGASAA	YASFFAVMG	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	7*51
DC 31 FS	P61421	V-type proton ATPase subunit d 1	8.26E+07	SFEQmEAVNIAQTPA	15	M	FEQMEAVNI	FEQMEAVNI	ALTA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	7*51
DC 31 LPS	P60709	Actin, cytoplasmic 1	4.73E+07	AVFPSIVGR	9	C	AVFPSIVGR	AVFPSIVGR	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	No analizada
DC 31 LPS	P60709	Actin, cytoplasmic 1	7.52E+07	LDFEQEmATASSSS	14	C	FEQEMATAA	FEQEMATAA	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	1*51
DC 31 LPS	P60709	Actin, cytoplasmic 1	7.95E+07	LDFEQEmATASSSS	15	C	FEQEMATAA	MATAASSSS	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	5*51
DC 31 LPS	P60709	Actin, cytoplasmic 1	7.87E+07	LDFEQEmATASSSS	15	C	FEQEMATAA	MATAASSSS	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	5*51
DC 31 LPS	P60709	Actin, cytoplasmic 1	8.52E+07	LDFEQEmATASSSSL	16	C	FEQEMATAA	MATAASSSS	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	4*51
DC 31 LPS	P60709	Actin, cytoplasmic 1	8.96E+07	SYELPDGQVITIGNER	16	C	YELPDGQVI	YELPDGQVI	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	0*51
DC 31 LPS	P60709	Actin, cytoplasmic 1	8.96E+07	SYELPDGQVITIGNER	16	C	YELPDGQVI	YELPDGQVI	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	0*51
DC 31 LPS	P60709	Actin, cytoplasmic 1	8.37E+07	VALDFEQEmATASSS	16	C	FEQEMATAA	FEQEMATAA	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	1*51
DC 31 LPS	P60709	Actin, cytoplasmic 1	8.80E+07	VALDFEQEmATASSSS	17	C	FEQEMATAA	MATAASSSS	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	1*51
DC 31 LPS	P15144	Aminopeptidase N	6.04E+07	IINDAFNLASAHKVPVT	17	M	FNLASAHKV	FNLASAHKV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	19*51
DC 31 LPS	P15144	Aminopeptidase N	7.98E+07	INDAFNLASAHKVPV	15	N	FNLASAHKV	FNLASAHKV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	13*51
DC 31 LPS	P56385	ATP synthase subunit e, mitochondrial	6.46E+07	VPPVQVSPLIKLGYSAL	18	Mit	LIKLGYSAL	VQVSPLIKL	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	22*51
DC 31 LPS	P25774	Cathepsin S	7.23E+07	TGKLVLSAQNLVD	14	End/Lis	LVLSAQNL	LVLSAQNL	ALTA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	11*51
DC 31 LPS	P11717	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	1.08E+08	DLNPLIKLSGAYLVDDSDPD	20	End/Lis	LIKLSGAYL	IKLSGAYLV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	34*51
DC 31 LPS	Q9NZ23	Charged multivesicular body protein 5	9.38E+07	AQQFSNmEQANYTIS	16	End/Lis	FNMEQANYT	FNMEQANYT	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	5*51
DC 31 LPS	Q9BZJ0	Crooked neck-like protein 1	5.74E+07	FAELETILGDIRAR	15	N	FAELETILG	FAELETILG	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	1*51
DC 31 LPS	P13073	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	4.93E+07	AHESVVKSE	9	C	AHESVVKSE	AHESVVKSE	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	No analizada
DC 31 LPS	P20674	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	6.79E+07	GISTPEELGLDKV	13	Mit	ISTPEELGL	ISTPEELGL	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	0*51
DC 31 LPS	Q12882	Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP+]	5.92E+07	SPATVSHQKGPVPRIA	17	C	VSHQKGPV	VSHQKGPV	INDETERMINADA	BAJA	DRB1*01:01	0*51
DC 31 LPS	P68104	Elongation factor 1-alpha 1	8.44E+07	VETGVLKPGmVVFAPVNVITTEVK	24	N	VVTFAPVNV	VVTFAPVNV	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	31*51
DC 31 LPS	P06396	Gelsolin	5.83E+07	TGDAYVILKTVQLRNG	16	C	YVILKTVQL	YVILKTVQL	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	51*51
DC 31 LPS	Q9Y5Q9	General transcription factor 3C polypeptide 3	7.54E+07	mEDVNIAAELYSINKQYDK	19	N	VNIAAELYI	VNIAAELYI	INTERMEDIA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	18*51
DC 31 LPS	P35754	Glutaredoxin-1	6.20E+07	IQDYLLQLTGARTVPR	16	C	LQQLTGART	LTGARTVPR	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	6*51
DC 31 LPS	Q7Z5G4	Golgin subfamily A member 7	9.70E+07	VSKYIQEQNEKIYAPQ	16	G	YIQEQNEKI	YIQEQNEKI	INDETERMINADA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	3*51
DC 31 LPS	P02790	Hemopexin	7.91E+07	SDVEKLNAAKALPQP	15	E/ECM	VEKLNAAKA	LNAAKALPQ	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	7*51
DC 31 LPS	P02790	Hemopexin	8.55E+07	SDVEKLNAAKALPQPQ	16	E/ECM	VEKLNAAKA	LNAAKALPQ	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	7*51
DC 31 LPS	P02790	Hemopexin	8.72E+07	YSDEKLNAAKALPOP	16	E/ECM	VEKLNAAKA	LNAAKALPQ	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	7*51
DC 31 LPS	P02790	Hemopexin	6.25E+07	YSDEKLNAAKALPQPQ	17	E/ECM	VEKLNAAKA	LNAAKALPQ	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	7*51
DC 31 LPS	P04908	Histone H2A type 1-B/E	4.73E+07	AGLQFPVGR	9	N	AGLQFPVGR	AGLQFPVGR	INDETERMINADA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	No analizada
DC 31 LPS	O60814	Histone H2B type 1-K	8.89E+07	AmGImNSFVNDIFer	15	N	MGIMNSFVN	IMNSFVNDI	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	34*51
DC 31 LPS	O60814	Histone H2B type 1-K	8.88E+07	AmGImNSFVNDIFer	15	N	MGIMNSFVN	IMNSFVNDI	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	34*51
DC 31 LPS	P62805	Histone H4	6.64E+07	TVTAmDVVYALK	12	N	VTAMDVVYA	VTAMDVVYA	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	7*51
DC 31 LPS	P10314	HLA class I histocompatibility antigen, A-32 alpha chain	8.18E+07	GDGTFQKwasVVPVSG	16	M	FQKwasVVPV	FQKwasVVPV	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	6*51
DC 31 LPS	Q31612	HLA class I histocompatibility antigen, B-73 alpha chain	5.07E+07	AVVVPVSGQEQ	10	M	VVVPVSGQEQ	VVVPVSGQEQ	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	0*51
DC 31 LPS	P04222;Q31612	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-3 alpha chain	8.10E+07	GDGTFQKwaAVVVPVSG	16	M	FQKwaAVVVPV	FQKwaAVVVPV	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*01:01/D RB1*07.01	3*51
DC 31 LPS	P04233	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain	9.16E+07	mATPLLmQALPmGALPQ	17	M	LQALPMGA	MQALPMGAL	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	22*51
DC 31 LPS	P04233	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain	9.08E+07	MATPLLmQALPmGALPQ	17	M	LQALPMGA	MQALPMGAL	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	22*51

DC 31 LPS	P04233	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain	9,44E+07	mATPLLMQALPmGALPQG	18	M	LMQALPMGA	MQALPMGAL	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	22*51	
DC 31 LPS	P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	7,99E+07	AQGALANIADVKANLE	16	M	LANIADVKA	LANIADVKA	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	0*51	
DC 31 LPS	P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	7,99E+07	EAQGALANIADVKANL	16	M	LANIADVKA	LANIADVKA	BAJA	BAJA	DRB1*01:01	0*51	
DC 31 LPS	P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	6,55E+07	IKEEHVVIQAE	11	M	IKEEHVIQ	IKEEHVIQ	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	2*51	
DC 31 LPS	Q13349/P1121	5	Integrin alpha-D	7,97E+07	APHYYEQTRGGQVS	14	M	YEQTRGGQV	YEQTRGGQV	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	0*51
DC 31 LPS	Q13349	Integrin alpha-D	9,23E+07	DTSVYSQLPGQEAfM	16	M	YSQLPGQEA	YSQLPGQEA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	1*51	
DC 31 LPS	Q13349	Integrin alpha-D	9,15E+07	DTSVYSQLPGQEAfMR	16	M	YSQLPGQEA	YSQLPGQEA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	1*51	
DC 31 LPS	Q13349	Integrin alpha-D	9,96E+07	FDTSVYSQLPGQEAfM	17	M	YSQLPGQEA	FDTSVYSQL	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	1*51	
DC 31 LPS	P11215	Integrin alpha-M	8,04E+07	DSVFTLLPGQGAFVR	15	M	FLLPGQGA	FLLPGQGA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	2*51	
DC 31 LPS	P11215	Integrin alpha-M	8,30E+07	FGQSVVQLQGSRVVVG	16	M	VVQLQGSRV	VQLQGSRVV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	28*51	
DC 31 LPS	P11215	Integrin alpha-M	9,79E+07	FGQSVVQLQGSRVVVGAPQ	19	M	VVQLQGSRV	VQLQGSRVV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	27*51	
DC 31 LPS	P11215	Integrin alpha-M	8,59E+07	FGQSVVQLQGSRVVVG	17	M	VVQLQGSRV	VQLQGSRVV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	27*51	
DC 31 LPS	P11215	Integrin alpha-M	1,01E+08	FGQSVVQLQGSRVVVGAPQ	20	M	VVQLQGSRV	VQLQGSRVV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	27*51	
DC 31 LPS	P11215	Integrin alpha-M	7,57E+07	GQSVVQLQGSRVVVG	15	M	VVQLQGSRV	VQLQGSRVV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	24*51	
DC 31 LPS	P11215	Integrin alpha-M	9,05E+07	GQSVVQLQGSRVVVGAPQ	18	M	VVQLQGSRV	VQLQGSRVV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	24*51	
DC 31 LPS	P11215	Integrin alpha-M	8,61E+07	NDSVFTLLPGQAFVR	16	M	FLLPGQGA	FLLPGQGA	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	2*51	
DC 31 LPS	P11215	Integrin alpha-M	7,46E+07	SVFTLLPGQAFVR	14	M	FLLPGQGA	FLLPGQGA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	2*51	
DC 31 LPS	P11215	Integrin alpha-M	8,86E+07	TPLSAFGLRPVLAEDA	17	M	FGNLRPVLA	LRPVLAEDA	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	21*51	
DC 31 LPS	P11215	Integrin alpha-M	9,50E+07	TPLSAFGLRPVLAEDAQ	18	M	FGNLRPVLA	LRPVLAEDA	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	21*51	
DC 31 LPS	P05107	Integrin beta-2	8,75E+07	NSNQFTQEVGKQLISG	16	M	FQTEVGKQL	FQTEVGKQL	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	2*51	
DC 31 LPS	Q8N370	Large neutral amino acids transporter small subunit 4	8,00E+07	YPSTQFGLTGLQSL	15	M	FGSLTGLQS	YPSTQFGLS	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	18*51	
DC 31 LPS	Q8N370	Large neutral amino acids transporter small subunit 4	9,00E+07	YPSTQFGLTGLQSLIS	17	M	FGSLTGLQS	YPSTQFGLS	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	18*51	
DC 31 LPS	Q8NHJ6	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 4	6,59E+07	APQDVTYAQLHSFTRLQ	17	M	YAQLHSFTL	YAQLHSFTL	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	5*51	
DC 31 LPS	Q99732	Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor	8,38E+07	AVNSYPTPPAPmPGP	16	End/Lis	YYPTPPAPM	YYPTPPAPM	INDETERMINADA	ALTA	DRB1*07:01	7*51	
DC 31 LPS	Q99732	Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor	8,88E+07	AVNSYPTPPAPmPGPT	17	End/Lis	YYPTPPAPM	YYPTPPAPM	INDETERMINADA	ALTA	DRB1*07:01	7*51	
DC 31 LPS	P06858	Lipoprotein lipase	6,89E+07	AGYTKLVGQDVAR	13	M	YTKLVGQDV	YTKLVGQDV	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	1*51	
DC 31 LPS	P06858	Lipoprotein lipase	6,55E+07	SAGYTKLVGQDVA	13	M	YTKLVGQDV	YTKLVGQDV	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	1*51	
DC 31 LPS	P06858	Lipoprotein lipase	4,89E+07	SAGYTKLVGQDVAR	14	M	YTKLVGQDV	YTKLVGQDV	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	1*51	
DC 31 LPS	P06858	Lipoprotein lipase	6,09E+07	YPSVAGYTKLVGQDVAR	17	M	YTKLVGQDV	YTKLVGQDV	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	3*51	
DC 31 LPS	P38571	Lysosomal acid lipase/cholesterol ester hydrolase	7,34E+07	IKmFFALGPVASVA	14	End/Lis	FFALGPVAS	IKMFFALGP	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	37*51	
DC 31 LPS	P22897	Macrophage mannose receptor 1	6,41E+07	FISQLGYEPPN	11	End/Lis	IISQLGYEP	FISQLGYE	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	4*51	
DC 31 LPS	Q9P177	MyoD family inhibitor domain-containing protein	6,50E+07	NPSDGLRTPQRLRQ	17	N	LIRTPQRL	LIRTPQRL	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	17*51	
DC 31 LPS	P15586	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	5,74E+07	FmmIATPAPH	10	End/Lis	FMMIATPAP	FMMIATPAP	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	44*51	
DC 31 LPS	P15586	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	6,18E+07	FmmIATPAPHS	11	End/Lis	FMMIATPAP	FMMIATPAP	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	44*51	
DC 31 LPS	P15586	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	6,66E+07	FmmIATPAPHSP	12	End/Lis	FMMIATPAP	FMMIATPAP	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	44*51	
DC 31 LPS	O00483	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	6,36E+07	VFIGTGATGATLY	13	Mit	FIGTGATGA	FIGTGATGA	ALTA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	3*51	
DC 31 LPS	P46531	Neurogenic locus notch homolog protein 1	8,90E+07	VPNQYPLRGSVAPGPL	17	M	YNPLRGSVA	LRGSVAPGP	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	4*51	
DC 31 LPS	Q15233	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	8,23E+07	GTLGLTPPTTERFGQA	16	N	LGLTPPTE	LGLTPPTE	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	0*51	
DC 31 LPS	A2BFH1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A-like 4G	5,89E+07	ANAGPNTNGSQF	12	C	ANAGPNTNG	GPNTNGSQF	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	0*51	
DC 31 LPS	Q9BTU6	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	8,97E+07	LNQGYLSEAGASLDQK	17	G	YLSEAGASL	YLSEAGASL	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	1*51	
DC 31 LPS	Q9BTU6	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	7,76E+07	NQGYLSEAGASLDVQ	15	G	YLSEAGASL	YLSEAGASL	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	1*51	
DC 31 LPS	Q9BTU6	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2-alpha	8,40E+07	NQGYLSEAGASLDQK	16	G	YLSEAGASL	YLSEAGASL	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	1*51	
DC 31 LPS	P07602	Proactivator polypeptide	5,27E+07	ALVEHVKEE	9	End/Lis	ALVEHVKEE	ALVEHVKEE	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	No analizada	
DC 31 LPS	P07737	Profilin-1	8,22E+07	TFVNITPAEVLVVGK	16	C	FVNITPAEV	FVNITPAEV	ALTA	INDETERMINADA	DRB1*01:01		
DC 31 LPS	O75629	Protein CREG1	5,44E+07	LATISTLEAVRGRPF	15	E/ECM	ISTLEAVRG	LATISTLEA	INTERMEDIA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	18*51	
DC 31 LPS	O75629	Protein CREG1	5,68E+07	LATISTLEAVRGRPFA	16	E/ECM	ISTLEAVRG	LATISTLEA	INTERMEDIA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	18*51	
DC 31 LPS	O75695	Protein XRP2	8,25E+07	AGDYTIANARKLIDE	15	M	YTIANARKL	YTIANARKL	ALTA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	14*51	
DC 31 LPS	P51148	Ras-related protein Rab-5C	7,84E+07	SPNVIALAGNKADLA	16	End/Lis	VIALAGNKA	VIALAGNKA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	20*51	
DC 31 LPS	P51148	Ras-related protein Rab-5C	8,27E+07	SPNVIALAGNKADLAS	17	End/Lis	VIALAGNKA	VIALAGNKA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	20*51	
DC 31 LPS	P02768	Serum albumin	6,03E+07	EQLGEYKFNALLVR	15	E/ECM	YKFNALLV	YKFNALLV	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	18*51	
DC 31 LPS	P61956	Small ubiquitin-related modifier 2	1,02E+08	GQPINETDTPAQLEmEDE	18	N	INETDTPAQ	INETDTPAQ	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	0*51	
DC 31 LPS	P23246	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	8,98E+07	VFLTTTPRPVIVEPL	16	N	VFLTTTPR	LLTTTPRPV	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	15*51	
DC 31 LPS	O00560	Syntenin-1	9,36E+07	NPANPAIASEASAPIPHDG	19	M	ILSEASAPI	ILSEASAPI	INTERMEDIA	ALTA	DRB1*07:01	4*51	
DC 31 LPS	O00560	Syntenin-1	8,30E+07	VDKVIQAQTAFSANPA	16	M	IQAQTAFA	IQAQTAFA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	34*51	
DC 31 LPS	O00560	Syntenin-1	9,36E+07	VDKVIQAQTAFSANPAMP	18	M	IQAQTAFA	IQAQTAFA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	34*51	
DC 31 LPS	O00560	Syntenin-1	9,72E+07	VDKVIQAQTAFSANPAMP	19	M	IQAQTAFA	IQAQTAFA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	34*51	
DC 31 LPS	P13686	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5	6,68E+07	LGDNFYFTGVQDINDKR	17	End/Lis	FYFTGVQDI	FYFTGVQDI	INDETERMINADA	ALTA	DRB1*07:01	12*51	
DC 31 LPS	P02786	Transferrin receptor protein 1	5,68E+07	IPVQITISAAAEKFLG	16	M	ISRAAAEKL	ISRAAAEKL	ALTA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	14*51	
DC 31 LPS	Q15582	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	6,77E+07	APTNEAFEKIPSETLNRI	18	E/ECM	FEKIPSETL	FEKIPSETL	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	2*51	
DC 31 LPS	Q9Y310	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	5,13E+07	AAFDMNDPE	9	N	AAFDMNDPE	AAFDMNDPE	BAJA	INDETERMINADA	DRB1*01:01/D RB1*07:01	No analizada	
DC 31 LPS	P01375	Tumor necrosis factor	5,74E+07	LGGVFLQLEKGDRLSAE	16	M	FQLEKGDRL	FQLEKGDRL	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	12*51	
DC 31 LPS	P08670	Vimentin	5,85E+07	ILLAELEQL	10	C	ILLAELEQL	ILLAELEQL	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01	2*51	
DC 31 LPS	P27449	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit	6,47E+07	ASFFAVmGASAAm	13	M	FAVMGASAA	FAVMGASAA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	7*51	
DC 31 LPS	P27449	V-type proton ATPase 16 kDa proteolipid subunit	4,94E+07	FAVMGASAAm	10	M	FAVMGASAA	FAVMGASAA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	7*51	
DC 31 LPS	P61421	V-type proton ATPase subunit d 1	7,91E+07	SFEQmEAVNIQAQTP	14	M	FEQmEAVNI	FEQmEAVNI	ALTA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	7*51	

DC 31 LPS	P61421	V-type proton ATPase subunit d 1	8.26E+07	SFEQmEAVNIQTPA	15	N	FEQMEAVNI	FEQMEAVNI	ALTA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	7*51
									DRB1*09:01	DRB1*10:01		
DC 16 FS	P15144	Aminopeptidase N	1.70E+03	INDAFNLASAHKVPVT	16	M	FNLSAHKV	FNLSAHKV	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	7 de 51
DC 16 FS	Q06481	Amyloid-like protein 2	1.57E+03	EQDGLLIGAEKVIN	15	M	LIGAEKVI	LIGAEKVI	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	6 de 51
DC 16 FS	Q06481	Amyloid-like protein 2	1.53E+03	DGGLIGAEKVINSK	15	M	LIGAEKVI	LIGAEKVI	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	6 de 51
DC 16 FS	Q10589	Bone marrow stromal antigen 2	1.74E+03	KVEELEGEITLNLHK	15	G	VEELEGEIT	LEGEITLNL	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	0 de 51
DC 16 FS	Q9UBR2	Cathepsin Z	1.88E+03	DLVSDVYAHQHGIPDE	16	End/Lis	WDYAHQHG	YAHQHGIPD	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	51 de 51
DC 16 FS	P11717	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	1.61E+03	GPLKFLHQDIDSGQG	15	End/Lis	LKFLHQDID	LKFLHQDID	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	27 de 51
DC 16 FS	Q13443	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 9	1.49E+03	SGGNLIPARPAPAPP	15	M	LIPARPAPA	LIPARPAPA	BAJA	INDETERMINADA	No asignada	27 de 51
DC 16 FS	P31689	DnaJ homolog subfamily A member 1	1.80E+03	ETTYDVLGVKPNATQ	16	Mit	VLGVKPNAT	VLGVKPNAT	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	27 de 51
DC 16 FS	P68104	Elongation factor 1-alpha 1	1.68E+03	TIEKFEKAEAEKMGK	15	N	FEKAEAEKMG	FEKAEAEKMG	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	27 de 51
DC 16 FS	P13639	Elongation factor 2	1.59E+03	DPANGKFSKATSPEG	16	N	FSKATSPE	FSKATSPE	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	0 de 51
DC 16 FS	P17813	Endoglin	1.96E+03	EPGQSFVQVRVSPVSE	18	M	FVQVRVSPS	FVQVRVSPS	INDETERMINADA	BAJA	No asignada	0 de 51
DC 16 FS	P17813	Endoglin	1.83E+03	EPGQSFVQVRVSPSVS	17	M	FVQVRVSPS	FVQVRVSPS	INTERMEDIA	INDETERMINADA	No asignada	34 de 51
DC 16 FS	P27105	thocyte band 7 integral membrane protein	1.49E+03	LQTLTTIAAEKNST	14	M	LQTLTTIAA	LQTLTTIAA	INTERMEDIA	INDETERMINADA	No asignada	34 de 51
DC 16 FS	P27105	thocyte band 7 integral membrane protein	1.70E+03	LQTLTTIAAEKNSTIV	16	M	LQTLTTIAA	LQTLTTIAA	INTERMEDIA	INDETERMINADA	No asignada	34 de 51
DC 16 FS	P17900	Ganglioside GM2 activator	1.57E+03	TTGMYRIEVLSSSG	15	End/Lis	YRIEVLSS	YRIEVLSS	ALTA	INDETERMINADA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	16 de 51
DC 16 FS	P11413	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1.71E+03	DDAASYQLNSHMNA	15	C	YQLNSHMN	YQLNSHMN	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	1 de 51
DC 16 FS	P11413	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1.59E+03	DAASYQLNSHMNA	14	C	YQLNSHMN	YQLNSHMN	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	1 de 51
DC 16 FS	P06744	Glucose-6-phosphate isomerase	1.81E+03	ASKTFTTQETITNAETA	17	C	FTTQETITN	FTTQETITN	INDETERMINADA	INDETERMINADA	No asignada	29 de 51
DC 16 FS	P09211	Glutathione S-transferase P	1.63E+03	SPEYVNLPIGNGKQ	15	C	YVNLPIGNG	YVNLPIGNG	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	29 de 51
DC 16 FS	P09211	Glutathione S-transferase P	1.50E+03	SPEYVNLPIGNGK	14	C	YVNLPIGNG	YVNLPIGNG	INDETERMINADA	INDETERMINADA	No asignada	9 de 51
DC 16 FS	P09211	Glutathione S-transferase P	1.70E+03	ASPEYVNLPIGNGKQ	16	C	YVNLPIGNG	YVNLPIGNG	INDETERMINADA	INDETERMINADA	No asignada	9 de 51
DC 16 FS	P09211	Glutathione S-transferase P	1.57E+03	ASPEYVNLPIGNGK	15	C	YVNLPIGNG	YVNLPIGNG	INDETERMINADA	INDETERMINADA	No asignada	2 de 51
DC 16 FS	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	1.70E+03	ANGLINVSADVKTGKE	17	N	ILNVSADV	ILNVSADV	INDETERMINADA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	2 de 51
DC 16 FS	P01891	HLA class I histocompatibility antigen, A-68 alpha chain	1.96E+03	YVDDTQFVRFDSDAASQ	17	M	FVRFSDAA	FVRFSDAA	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	0 de 51
DC 16 FS	P01891	HLA class I histocompatibility antigen, A-68 alpha chain	1.80E+03	VDDTQFVRFDSDAASQ	16	M	FVRFSDAA	FVRFSDAA	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	17 de 51
DC 16 FS	P01891	HLA class I histocompatibility antigen, A-68 alpha chain	1.59E+03	VDDTQFVRFDSDAA	14	M	FVRFSDAA	FVRFSDAA	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	17 de 51
DC 16 FS	P13747	HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain E	1.85E+03	DDTQFVRFDNDASPR	16	M	FVRFNDAA	FVRFNDAA	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	24 de 51
DC 16 FS	P01889	HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain	1.93E+03	VDDTQFVRFDSDAASPR	17	M	FVRFSDAA	FVRFSDAA	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	17 de 51
DC 16 FS	P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	1.71E+03	AQGALANIAVDKANLEI	17	M	LANIAVDKA	LANIAVDKA	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	17 de 51
DC 16 FS	P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	1.53E+03	QGALANIAVDKANLE	15	M	LANIAVDKA	LANIAVDKA	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	17 de 51
DC 16 FS	P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	1.60E+03	AQGALANIAVDKANLE	16	M	LANIAVDKA	LANIAVDKA	INDETERMINADA	BAJA	No asignada	17 de 51
DC 16 FS	QY9287	Integral membrane protein 2B	1.82E+03	VPVEFADSDPANIVHD	17	G	FADSDPANI	FADSDPANI	INDETERMINADA	INDETERMINADA	No asignada	17 de 51
DC 16 FS	P11215	Integrin alpha-M	1.52E+03	VNNFEALKTIQNG	13	M	FEALKTIQN	VNNFEALKT	INTERMEDIA	ALTA	DRB1*10:01	21 de 51
DC 16 FS	P11215	Integrin alpha-M	1.90E+03	TPLSAGFNLRPVLAEADQ	18	M	LRPVLAEAD	FGNLRPVLV	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	2 de 51
DC 16 FS	P11215	Integrin alpha-M	1.69E+03	GTSGSGSPSHSQRIAGS	18	M	ISPSHSQRI	ISPSHSQRI	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	2 de 51
DC 16 FS	P11215	Integrin alpha-M	1.53E+03	SGSGSPSHSQRIAGS	16	M	ISPSHSQRI	ISPSHSQRI	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	17 de 51
DC 16 FS	P20702	Integrin alpha-X	1.91E+03	LPQGEAFMRAQTITVLE	17	M	FMRAQTITV	FMRAQTITV	INDETERMINADA	INDETERMINADA	No asignada	32 de 51
DC 16 FS	P05107	Integrin beta-2	1.78E+03	DNPLFKSATTIVMNP	16	M	FKSATTIVM	FKSATTIVM	INDETERMINADA	INDETERMINADA	No asignada	31 de 51
DC 16 FS	P05107	Integrin beta-2	1.99E+03	LEDNLYKRSNEFDYPS	16	M	YKRSNEFDY	YKRSNEFDY	INDETERMINADA	INDETERMINADA	No asignada	32 de 51
DC 16 FS	P05107	Integrin beta-2	1.88E+03	EDNLYKRSNEFDYPS	15	M	YKRSNEFDY	YKRSNEFDY	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	3 de 51
DC 16 FS	P06858	Lipoprotein lipase	1.38E+03	AGYTKLVGQDVV	13	M	YTKLVGQDV	YTKLVGQDV	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	3 de 51
DC 16 FS	Q13287	N-myc-interactor	1.78E+03	ALITFEKEEVAQNVS	16	C	LITFEKEEV	FEKEEVAQN	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	8 de 51
DC 16 FS	Q13093	Platelet-activating factor acetylhydrolase	1.50E+03	NFADFATGKGI	14	E/ECM	FTFATGKII	FTFATGKII	INDETERMINADA	ALTA	DRB1*10:01	21 de 51
DC 16 FS	P26447	Protein S100-A4	1.70E+03	DEAAFQKMLNSLNSD	15	C	FQKMLNSLD	FQKMLNSLD	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	0 de 51
DC 16 FS	A6NMY6	Putative annexin A2-like protein	1.92E+03	TPPSAYGSKVAYTNFDAE	18	E/ECM	YGSVKAYTN	YGSVKAYTN	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	0 de 51
DC 16 FS	A6NMY6	Putative annexin A2-like protein	1.92E+03	TPPSAYGSKVAYTNFDAE	18	E/ECM	YGSVKAYTN	YGSVKAYTN	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	0 de 51
DC 16 FS	A6NMY6	Putative annexin A2-like protein	1.72E+03	TPPSAYGSKVAYTNFND	16	E/ECM	YGSVKAYTN	YGSVKAYTN	INDETERMINADA	INDETERMINADA	No asignada	6 de 51
DC 16 FS	Q75787	Renin receptor	1.52E+03	NEFSILKSPGSVVF	14	M	FSILKSPGS	FSILKSPGS	INTERMEDIA	ALTA	DRB1*10:01	14 de 51
DC 16 FS	P10124	Serglycin	1.80E+03	GPMPFELLPGESNKIPR	16	E/ECM	MPFELLPGES	FELLPGESN	INDETERMINADA	INDETERMINADA	No asignada	14 de 51
DC 16 FS	P10124	Serglycin	1.93E+03	KGPMFELLPGESNKIPR	17	E/ECM	MPFELLPGES	FELLPGESN	INDETERMINADA	INTERMEDIA	No asignada	5 de 51
DC 16 FS	Q08ET2	Sialic acid-binding Ig-like lectin 14	1.85E+03	EIPYVAVVATNPNDR	16	M	VVATNPNDR	YVAVVATN	ALTA	ALTA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	41 de 51
DC 16 FS	Q9UGQ3	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 6	1.50E+03	IPVYVEIAPPVNR	14	M	YVVEIAPPG	YVVEIAPPG	INDETERMINADA	INTERMEDIA	No asignada	1 de 51
DC 16 FS	Q00560	Syntenin-1	1.87E+03	VDKVIQAQTAFSANPANP	18	M	IQAQTAFSA	IQAQTAFSA	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	13 de 51
DC 16 FS	Q00560	Syntenin-1	1.94E+03	VDKVIQAQTAFSANPANPA	19	M	IQAQTAFSA	IQAQTAFSA	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	0 de 51
DC 16 FS	Q00560	Syntenin-1	1.66E+03	VDKVIQAQTAFSANPA	16	M	IQAQTAFSA	IQAQTAFSA	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	0 de 51
DC 16 FS	P02786	Transferrin receptor protein 1	1.56E+03	NPGGYVAYSKAATVGT	16	M	VAYSKAATV	VAYSKAATV	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	1 de 51
DC 16 FS	P02786	Transferrin receptor protein 1	1.69E+03	VEYHFLSPYVSPKE	14	M	YHFLSPYVS	YHFLSPYVS	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	7 de 51
DC 16 FS	P02786	Transferrin receptor protein 1	1.72E+03	RVEYHFLSPYVSPK	14	M	YHFLSPYVS	YHFLSPYVS	ALTA	ALTA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	13 de 51
DC 16 FS	P02786	Transferrin receptor protein 1	1.57E+03	VEYHFLSPYVSPK	13	M	YHFLSPYVS	YHFLSPYVS	ALTA	ALTA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	20 de 51
DC 16 FS	P08670	Vimentin	1.21E+03	FGPGGTASRPSSS	13	C	FGPGGTASR	FGPGGTASR	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	0 de 51

DC 16 LPS	Q9H299	SH3 domain-binding glutamic acid-rich like protein 3	1.96E+03	DGKRIQYLVLDISQDNA	17	C	YQLVLDISQD	IYQLVLDIS	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	31 de 51
DC 16 LPS	P62899	60S ribosomal protein L31	1.27E+03	KNLQTVNVVDEN	11	C	LQTVNVVDEN	LQTVNVVDEN	INTERMEDIA	ALTA	DRB1*10:01	6 de 51
DC 16 LPS	P53634	Dipeptidyl peptidase 1	1.64E+03	VVYVQLKLDATYDD	14	End/Lis	VVYVQLKLD	VVYVQLKLD	INDETERMINADA	BAJA	No asignada	0 de 51
DC 16 LPS	P53634	Dipeptidyl peptidase 1	1.74E+03	NVHGINFVSPVRNQAS	16	End/Lis	INFVSPVRN	INFVSPVRN	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	27 de 51
DC 16 LPS	P17813	Endoglin	1.96E+03	EPGQQSFVQVRVSPVSE	18	M	FVQVRVSPS	FVQVRVSPS	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	27 de 51
DC 16 LPS	O00602	Ficolin-1	1.51E+03	GMDNIHALTAQGSSE	15	E/ECM	IHALTAQGS	IHALTAQGS	BAJA	INDETERMINADA	No asignada	44 de 51
DC 16 LPS	P09211	Glutathione S-transferase P	1.63E+03	SPEYVNLPIPINGKQ	15	C	YVNLPIGN	YVNLPIGN	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	12 de 51
DC 16 LPS	P09211	Glutathione S-transferase P	1.70E+03	ASPEYVNLPIPINGKQ	16	C	YVNLPIGN	YVNLPIGN	INTERMEDIA	INDETERMINADA	No asignada	34 de 51
DC 16 LPS	P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	1.45E+03	ANGLNVSADVSTG	15	N	ILNVSADVK	ILNVSADVK	INTERMEDIA	INTERMEDIA	No asignada	34 de 51
DC 16 LPS	P01891	HLA class I histocompatibility antigen, A-68 alpha chain	1.80E+03	VDDTQVFRFSDSAASQ	16	M	FVFRFSDAA	FVFRFSDAA	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	0 de 51
DC 16 LPS	P13747	HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain E	1.95E+03	VDDTQVFRFSDAASPR	17	M	FVFRFSDAA	FVFRFSDAA	INDETERMINADA	BAJA	No asignada	0 de 51
DC 16 LPS	P13747	HLA class I histocompatibility antigen, alpha chain E	1.85E+03	DDTQVFRFSDAASPR	16	M	FVFRFSDAA	FVFRFSDAA	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	0 de 51
DC 16 LPS	P01889	HLA class I histocompatibility antigen, B-7 alpha chain	1.93E+03	VDDTQVFRFSDAASPR	17	M	FVFRFSDAA	FVFRFSDAA	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	21 de 51
DC 16 LPS	Q9Y287	Integral membrane protein 2B	1.71E+03	VPVPEFADSDPANIVH	16	G	FADSDPANI	FADSDPANI	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	21 de 51
DC 16 LPS	P11215	Integrin alpha-M	1.90E+03	TPLSAFNGLRPVLAEADQ	18	M	LRPVLAEAD	FGNLRPVL	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	24 de 51
DC 16 LPS	P05107	Integrin beta-2	1.88E+03	EDNLKYLKRSNEFDYPS	15	M	YKRSNEFDY	YKRSNEFDY	INTERMEDIA	ALTA	DRB1*10:01	6 de 51
DC 16 LPS	P06858	Lipoprotein lipase	1.38E+03	AGYTKLVGQDVAR	13	M	YTKLVGQDV	YTKLVGQDV	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	24 de 51
DC 16 LPS	P06858	Lipoprotein lipase	1.46E+03	SAGYTKLVGQDVAR	14	M	YTKLVGQDV	YTKLVGQDV	INDETERMINADA	ALTA	DRB1*10:01	21 de 51
DC 16 LPS	O75787	Renin receptor	1.38E+03	NEFSILKSPGSVV	13	M	FSILKSPGS	FSILKSPGS	INDETERMINADA	INTERMEDIA	No asignada	1 de 51
DC 16 LPS	P10124	Serglycin	1.80E+03	GPMFELLPGESNKIPR	16	E/ECM	MFELLPGES	FELLPGESN	INDETERMINADA	INTERMEDIA	No asignada	1 de 51
DC 16 LPS	P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	1.81E+03	FDNQIHEADTTENQSG	16	M	IHEADTTEN	IHEADTTEN	ALTA	ALTA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	41 de 51
DC 16 LPS	O00560	Syntenin-1	1.94E+03	VDKVIAQATFASANPANPA	19	M	IAQATAFSA	IAQATAFSA	INDETERMINADA	BAJA	No asignada	
DC 16 LPS	O00560	Syntenin-1	1.66E+03	VDKVIAQATFASANPA	16	M	IAQATAFSA	IAQATAFSA	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	17 de 51
DC 16 LPS	P02786	Transferrin receptor protein 1	1.56E+03	NPGGYVAYSKAATVTG	16	M	VAYSKAATV	VAYSKAATV	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	1 de 51
DC 16 LPS	P08670	Vimentin	1.43E+03	SLYASSPGGYATR	14	C	LYASSPGGV	LYASSPGGV	BAJA	BAJA	DRB1*09:01/D RB1*10:01	0 de 51
DC 16 LPS	P08670	Vimentin	1.21E+03	FGPGGTASR	13	C	FGPGGTASR	FGPGGTASR	INTERMEDIA	ALTA	DRB1*10:01	21 de 51
									DRB1*01:01	DRB1*11:04		
DC 10 FS	P15144	Aminopeptidase N	1.70E+03	INDAFNLASAHKVPVT	16	M	FNLASAHKV	INDAFNLAS	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	13 de 51
DC 10 FS	Q92499	ATP-dependent RNA helicase DDX1	1.23E+03	LIIGVAAARDQL	12	N	LIIGVAAAR	LIIGVAAAR	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	15 de 51
DC 10 FS	P07858	Cathepsin B	1.55E+03	DNGFFKILRGQDH	13	End/Lis	FKILRGQDH	FKILRGQDH	ALTA	INDETERMINADA	DRB1*01:01	18 de 51
DC 10 FS	O00299	Chloride intracellular channel protein 1	1.67E+03	FSAYIKNSNPALNDN	15	M	YIKNSNPAL	IKNSNPALN	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	7 de 51
DC 10 FS	Q9UDW1	Cytochrome b-c1 complex subunit 9	1.30E+03	FFERAFDQGD	11	Mit	FERAFDQGA	FERAFDQGA	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	0 de 51
DC 10 FS	P20674	Cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial	1.42E+03	VIQELRPTLNEL	12	Mit	IQELRPTLN	VIQELRPTL	INTERMEDIA	INTERMEDIA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	0 de 51
DC 10 FS	O00182	Galectin-9	1.27E+03	VGGDIQLTHVQT	12	E/ECM	VGGDIQLTH	VGGDIQLTH	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	6 de 51
DC 10 FS	P15104	Glutamine synthetase	1.67E+03	LLNETGDEPFQYKN	14	Mit	LLNETGDEP	LLNETGDEP	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	0 de 51
DC 10 FS	P04406	Glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.30E+03	EFGYSNRVVDL	11	C	FGYSNRVVD	FGYSNRVVD	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	1 de 51
DC 10 FS	P02790	Hemopexin	1.87E+03	YSDYEDKLNAAKALPQPQ	17	E/ECM	VEKLNAAKA	LNAAKALPQ	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	7 de 51
DC 10 FS	P04440	HLA class II histocompatibility antigen, DP beta 1 chain	1.01E+03	VEGEFRAVTE	9	M	VEGEFRAVTE	VEGEFRAVTE	INDETERMINADA	INDETERMINADA	No asignada	No analizada
DC 10 FS	P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	1.60E+03	EAQGALANIAVDKANL	16	M	LANIAVDKA	LANIAVDKA	INDETERMINADA	INTERMEDIA	No asignada	0 de 51
DC 10 FS	P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	1.47E+03	AQGALANIAVDKANL	15	M	LANIAVDKA	LANIAVDKA	INDETERMINADA	INTERMEDIA	No asignada	0 de 51
DC 10 FS	P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	1.31E+03	IKEEHVIAQE	11	M	IKEEHVIAQ	IKEEHVIAQ	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	2 de 51
DC 10 FS	P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	1.11E+03	IKEEHVIAQ	9	M	IKEEHVIAQ	IKEEHVIAQ	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	No analizada
DC 10 FS	P04229	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-1 beta chain	1.02E+03	VEGEYRAVTE	9	M	VEGEYRAVTE	VEGEYRAVTE	INDETERMINADA	INDETERMINADA	No asignada	No analizada
DC 10 FS	Q13349	Integrin alpha-D	1.84E+03	DTSYVSQLPGQAFMR	16	M	YSQLPGQEA	VYSQLPGQE	ALTA	BAJA	DRB1*01:01	1 de 51
DC 10 FS	P11215	Integrin alpha-M	1.90E+03	TPLSAFNGLRPVLAEADQ	18	M	FGNLRPVL	LRPVLAEAD	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	21 de 51
DC 10 FS	P11215	Integrin alpha-M	1.77E+03	TPLSAFNGLRPVLAEADQ	17	M	FGNLRPVL	LRPVLAEAD	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	21 de 51
DC 10 FS	P11215	Integrin alpha-M	1.96E+03	FGQSVVQLQGSRVVVGAPQ	19	M	VVQLQGSRV	VQLQGSRVV	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	27 de 51
DC 10 FS	P11215	Integrin alpha-M	1.72E+03	FGQSVVQLQGSRVVVG	17	M	VVQLQGSRV	VQLQGSRVV	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	27 de 51
DC 10 FS	P11215	Integrin alpha-M	1.51E+03	GQSVVQLQGSRVVVG	15	M	VVQLQGSRV	VQLQGSRVV	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	21 de 51
DC 10 FS	P11215	Integrin alpha-M	2.01E+03	FGQSVVQLQGSRVVVGAPQ	20	M	VVQLQGSRV	VQLQGSRVV	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	27 de 51
DC 10 FS	Q15233	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	1.65E+03	GTLGLTPPTTFRGQA	16	N	LGLTPPTTE	LGLTPPTTE	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	0 de 51
DC 10 FS	Q9C002	Normal mucosa of esophagus-specific gene 1 protein	1.09E+03	LQNVRVTK	9	N	LQNVRVTK	LQNVRVTK	INDETERMINADA	INDETERMINADA	No asignada	No analizada
DC 10 FS	Q4VXU2	Polyadenylate-binding protein 1-like	1.32E+03	YVGDLPDVTAE	12	E/ECM	YVGDLPDVT	YVGDLPDVT	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	8 de 51
DC 10 FS	Q15084	Protein disulfide-isomerase A6	1.25E+03	VELDDLKDEL	11	R.E.	LDLKGDEL	VELDDLKGD	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	1 de 51
DC 10 FS	Q6NUK4	Receptor expression-enhancing protein 3	2.35E+03	EREIDDYVQAKERGYETM	19	R.E.	YVQAKERG	VQAKERGYE	BAJA	INTERMEDIA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	12 de 51
DC 10 FS	P02768	Serum albumin	1.31E+03	QLGEYKFNAL	11	E/ECM	LGEYKFNQA	LGEYKFNQA	BAJA	BAJA	DRB1*01:01	0 de 51
DC 10 FS	P02768	Serum albumin	1.57E+03	TPTLVEYSRNLGKVG	15	E/ECM	VSRNLGKVG	LVEYSRNLG	INDETERMINADA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	2 de 51
DC 10 FS	P02768	Serum albumin	2.02E+03	NALLVRYTKKVPQSTPT	18	E/ECM	VRYTKKVPQ	VRYTKKVPQ	BAJA	ALTA	DRB1*01:01	33 de 51
DC 10 FS	P23246	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	1.80E+03	VFLLTTPR	16	N	VFLLTTPR	VFLLTTPR	ALTA	INTERMEDIA	DRB1*01:01	15 de 51
DC 10 FS	P23246	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	1.15E+03	FSQFGPIER	10	N	FSQFGPIER	FSQFGPIER	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	No analizada
DC 10 FS	O00560	Syntenin-1	1.94E+03	VDKVIAQATFASANPANPA	19	M	IAQATAFSA	VIQATAFSA	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	34 de 51
DC 10 FS	O00560	Syntenin-1	1.66E+03	VDKVIAQATFASANPA	16	M	IAQATAFSA	VIQATAFSA	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	34 de 51

DC 10 FS	O00560	Syntenin-1	1,09E+03	LNEEEIRAN	9	M	LNEEEIRAN	LNEEEIRAN	INDERMINADA	BAJA	No asignada	No analizada
DC 10 LPS	P35368	Alpha-1B adrenergic receptor	1,01E+03	LDTGHNTSAP	10	N	LDTGHNTSA	LDTGHNTSA	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	0 de 51
DC 10 LPS	P15144	Aminopeptidase N	1,70E+03	INDAFNLASAHKVPVT	16	M	FNLASAHKV	INDAFNLAS	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	13 de 51
DC 10 LPS	P07858	Cathepsin B	1,55E+03	DNGFFKILRGQDH	13	End/Lis	FKILRGQDH	FKILRGQDH	ALTA	INDERMINADA	DRB1*01:01/D	18 de 51
DC 10 LPS	P13073	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial	9,85E+02	AHESVVKSE	9	Mit	AHESVVKSE	AHESVVKSE	INDERMINADA	BAJA	No asignada	No analizada
DC 10 LPS	P13284	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase	1,63E+03	DFGNGPPVNYKTGN	15	End/Lis	FGNGPPVNY	DFGNGPPVNY	INDERMINADA	BAJA	No asignada	1 de 51
DC 10 LPS	P13284	Gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase	1,24E+03	LEGEESRMSGE	11	End/Lis	LEGEESRMS	LEGEESRMS	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	0 de 51
DC 10 LPS	P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	1,60E+03	EAQGANLAVDKANL	16	M	LAVDKANL	EAQGANLAVDKANL	INDERMINADA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	0 de 51
DC 10 LPS	P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	1,31E+03	IKEEHVIAQE	11	M	IKEEHVIAQ	IKEEHVIAQ	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	2 de 51
DC 10 LPS	P01903	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	1,11E+03	IKEEHVIAQ	9	M	IKEEHVIAQ	IKEEHVIAQ	BAJA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	No analizada
DC 10 LPS	P04229	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-1 beta chain	1,02E+03	VGEYRAVTE	9	M	VGEYRAVTE	VGEYRAVTE	INDERMINADA	INDERMINADA	No asignada	No analizada
DC 10 LPS	Q13349	Integrin alpha-D	1,84E+03	DTSVYSQLPGQEAQFMR	16	M	YSQLPGQEA	VYSQLPGQEA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01/D	1 de 51
DC 10 LPS	Q13349	Integrin alpha-D	1,84E+03	DTSVYSQLPGQEAQFMR	16	M	YSQLPGQEA	VYSQLPGQEA	ALTA	BAJA	DRB1*01:01/D	1 de 51
DC 10 LPS	P11215	Integrin alpha-M	1,72E+03	GFGQSVVQLQGSRRVVG	17	M	VVQLQGSRV	VQLQGSRRV	ALTA	INDERMINADA	DRB1*01:01/D	27 de 51
DC 10 LPS	P11215	Integrin alpha-M	1,66E+03	FGQSVVQLQGSRRVVG	16	M	VVQLQGSRV	VQLQGSRRV	ALTA	INDERMINADA	DRB1*01:01/D	27 de 51
DC 10 LPS	Q15233	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	1,65E+03	GTLGLTPPTTTERFGQA	16	N	LGLTPPTE	LGLTPPTE	INTERMEDIA	BAJA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	0 de 51
DC 10 LPS	P02768	Serum albumin	2,02E+03	NALLVRYTKKVPQVSTPT	18	E/ECM	VRYTKKVPQ	VRYTKKVPQ	BAJA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	33 de 51
DC 10 LPS	P02768	Serum albumin	1,57E+03	TPTLVEVSRNLGKVG	15	E/ECM	VSRNLGKVG	LVEVSRNLG	INDERMINADA	INTERMEDIA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	2 de 51
DC 10 LPS	P62316	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 OS	1,48E+03	SVIVVLRNPLIAGK	14	N	IVVLRNPLI	VVLRNPLI	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	48 de 51
DC 10 LPS	O00560	Syntenin-1	1,94E+03	VDKVIQAQAFSANPANPA	19	M	IAQAQAFSA	VIQAQAFSA	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	34 de 51
DC 10 LPS	O00560	Syntenin-1	1,66E+03	VDKVIQAQAFSANPANPA	16	M	IAQAQAFSA	VIQAQAFSA	ALTA	ALTA	DRB1*01:01/D RB1*11:04	34 de 51

1. Número de acceso Uniprot; 2. Masa de la secuencia peptídica, 3. Tamaño del péptido en número de aminoácidos; 4. Afinidad teórica; 5. Promiscuidad teórica por propiedad