



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**MÁSTER EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA**

**ESPECIALIDAD: FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

**Curso académico 2017-2018**

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

**Proteómica dirigida aplicada a la búsqueda de  
biomarcadores en sueros de pacientes con artritis  
reumatoide**

**Selva Riva Mendoza**

**Tutor: Patricia Fernández Puente**

**21 de junio del 2018**



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

MÁSTER EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA

ESPECIALIDAD: FUNDAMENTOS DE LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Curso académico 2017-2018

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**

**Proteómica dirixida á busca de biomarcadores en  
soros de pacientes con artritis reumatoide**

**Targeted proteomics applied to the search of  
serum biomarkers in rheumatoid arthritis  
patients**

Dra. Patricia Fernández Puente,

Certifica:

Que el presente trabajo de Fin de Máster con título: Proteómica dirigida aplicada a la búsqueda de biomarcadores en sueros de pacientes con artritis reumatoide, elaborado por la alumna Selva Riva Mendoza, ha sido realizado bajo mi dirección y estimo que se encuentra concluido y en condiciones de ser presentado.

El Director,

Patricia Fernández Puente

Fdo.:



El tutor,

Silvia María Díaz Prado

Fdo.:

## RESUMEN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la inflamación de las articulaciones y por la presencia de factor reumático (RF) y antiproteínas citrulinadas (ACPA) en la sangre. La heterogeneidad de los pacientes y la ausencia de pruebas clínicas suficientemente precisas y sensibles para identificar las primeras etapas de la enfermedad impiden su diagnóstico temprano. Por ello, es de gran interés la búsqueda, identificación y verificación de biomarcadores específicos para el diagnóstico y los estudios de progresión en AR. El objetivo de este estudio es la aplicación de una estrategia proteómica dirigida basada en la técnica MRM (multi reaction monitoring) para detectar, cuantificar y verificar un panel de biomarcadores asociados con AR en sueros de pacientes individuales. El panel ha sido previamente identificado por el grupo de proteómica del INIBIC mediante técnicas de proteómica al azar. Para este estudio, 80 muestras de suero fueron clasificadas en función de la presencia/ausencia de RF y ACPA de la siguiente manera: 20 muestras RF+/ACPA+, 20 muestras RF+/ACPA-, 20 muestras RF-/ACPA+ y 20 muestras RF-/ACPA-. El análisis cuantitativo entre las distintas condiciones de estudio se llevó a cabo usando unos péptidos marcados isotópicamente en sus aminoácidos, como estándares internos. Para el desarrollo del método MRM y el análisis de datos se utilizó el programa Skyline. Se identificaron y cuantificaron 26 péptidos pertenecientes a 10 proteínas en un único análisis. El análisis estadístico mediante el Test de Mann-Whitney mostró una modulación significativa ( $p < 0.05$ ) para 8 proteínas: 4 proteínas en RF+/ACPA+, 5 proteínas en RF+/ACPA- y 6 proteínas en RF-/ACPA+ en comparación con RF-/ACPA-. Los resultados sugieren que estas proteínas están relacionadas con la AR. Actualmente, están en curso experimentos para la validación en otra cohorte de sueros, con un mayor número de pacientes para su posterior uso como biomarcadores de AR.

**Palabras clave:** artritis reumatoide, suero, biomarcador, proteómica dirigida

## RESUMO

A artritis reumatoide é unha enfermidade autoinmune caracterizada pola inflamación das articulacións e pola presenza de factor reumático (RF) e antiproteínas citrulinadas (ACPA) no sangue. A heteroxeneidade dos pacientes e a ausencia de probas clínicas suficientemente precisas e sensibles para identifica-las primeiras etapas da enfermidade impiden o seu diagnóstico precoz. Por elo, é de grande interese a busca, identificación e verificación de biomarcadores específicos para o diagnóstico e os estudos de progresión en AR. O obxectivo deste estudo é a aplicación dunha estratexia proteómica dirixida baseada na técnica MRM (multi reaction monitoring) para detectar, cuantificar e verificar un panel de biomarcadores asociados ca AR en soros de pacientes individuais. O panel foi previamente identificado polo grupo de proteómica do INIBIC mediante técnicas de proteómica ó azar. Para este estudo, 80 mostras de soro foron clasificadas en función da presenza/ausencia de RF y ACPA da seguinte maneira: 20 mostras RF+/ACPA+, 20 mostras RF+/ACPA-, 20 mostras RF-/ACPA+ y 20 mostras RF-/ACPA-. O análise cuantitativo entres as diferentes condicións de estudo levouse a cabo usando uns péptidos marcados isotópicamente nos seus aminoácidos, como estándares internos. Para o desenvolvemento do método MRM e o análise de datos utilizouse o programa Skyline. Identificáronse e cuantificáronse 26 péptidos pertencentes a 10 proteínas nun único análise. O análise estatístico mediante o Test de Mann-Whitney amosou unha modulación significativa ( $p < 0.05$ ) para 8 proteínas: 4 proteínas en RF+/ACPA+, 5 proteínas en RF+/ACPA- y 6 proteínas en RF-/ACPA+ en comparación con RF-/ACPA-. Os resultados suxiren que estas proteínas están relacionadas ca AR. Actualmente, están en curso experimentos para a validación noutra cohorte de soros, con un maior número de pacientes para o seu posterior uso como biomarcadores de AR.

**Palabras clave:** artritis reumatoide, soro, biomarcador, proteómica dirixida.

## **ABSTRACT**

Rheumatoid Arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by inflammation of the joints and by the presence of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) and Rheumatoid Factor (RF) in blood. The heterogeneity of patients and the lack of clinical tests accurate enough to identify the early stages of disease have hampered its early diagnosis. Therefore, the search, identification and verification of specific biomarkers for diagnosis and progression studies in AR are of great interest. The aim of this study was the application of a targeted proteomic approach based on MRM technic (multi reaction monitoring) to detect, quantify and verify a panel of biomarkers associated with AR in individual serum samples. The panel has been previously identified by the INIBIC proteomics group through shotgun proteomics. For this study, 80 serum samples were classified according to their absence/presence of RF and ACPA as follows: 20 samples RF+/ACPA+, 20 samples RF+/ACPA-, 20 samples RF-/ACPA+, 20 samples RF-/ACPA-. The quantitative analysis between the different study conditions was carried out using peptides marked isotopically in their amino acids, as internal standards. Skyline program was used for the development of the MRM method and data analysis. 26 peptides belonging to 10 proteins have been identified and quantified in a single analysis. Statistical analysis using the Mann-Whitney test showed a significant modulation ( $p < 0.05$ ) for 8 proteins: 4 proteins in RF + / ACPA +, 5 proteins in RF + / ACPA- and 6 proteins in RF- / ACPA + compared to RF- / ACPA-. The results suggest that these proteins are related with the RA, and further experiments are now in course to validate these results in another sera cohort, with a bigger number of patients for its later use as AR biomarkers.

**Keywords:** rheumatoid arthritis, serum, biomarker, targeted proteomics.

# ÍNDICE

1. Introducción.....	6
1.1. La artritis reumatoide .....	6
1.2. Diagnóstico y desarrollo de la enfermedad .....	8
1.3. Tratamiento.....	11
1.4. Proteómica en la búsqueda de biomarcadores y en la investigación de artritis reumatoide.....	11
1.5. Estrategias proteómicas .....	14
1.6. Cuantificación de los péptidos y proteínas.....	19
3. Material y métodos.....	21
3.1. Muestras.....	21
3.1.1. Cuantificación de la muestra	21
3.1.2. Digestión de la muestra	21
3.1.3. Péptidos sintéticos	22
3.1.4. Limpieza de sales con Stage-Tips	23
3.2. Nano-cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con la tecnología de triple cuadrupolo en modo MRM (nano-LC-MRM).....	24
3.3. Análisis de datos.....	26
3.4. Cuantificación.....	27
4. Resultados y discusión .....	28
6. Referencias .....	38
ANEXO I. Datos descriptivos de las muestras utilizadas en este estudio .....	42
ANEXO II. Proteínas analizadas mediante proteómica dirigida. ....	43
ANEXO III. Tablas resumen con las concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ ) de los péptidos endógenos calculados con el método del estándar interno .....	47

ACN	Acetonitrilo
ACP	Antipéptidos citrulinados
ACPA	Antiproteínas citrulinadas ( <i>Anti-citrullinated protein antibodies</i> )
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
Anti-CCP	Anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados
APR	Respuesta de fase aguda ( <i>Acute phase response</i> )
AR	Artritis reumatoide
BA	Bicarbonato amónico
BMP	Proteínas morfogenéticas óseas ( <i>bone morphogenetic protein</i> )
BMP-4	Proteína morfogenética 4 ( <i>bone morphogenetic protein-4</i> )
BMP-5	Proteína morfogenética 5 ( <i>bone morphogenetic protein-5</i> )
CE	Energía de colisión ( <i>Collision energy</i> )
CRP	Proteína C Reactiva ( <i>C-Reactive Protein</i> )
CUR	Gas cortina ( <i>Curtain gas</i> )
CXP	Potencial de salida de la celda de colisión ( <i>Collision cell exit potential</i> )
DAS	Índice de actividad de la enfermedad ( <i>Disease activity score</i> )
DP	Potencial de disgregación ( <i>Declustering potential</i> )
DTT	Ditiotreitol
EP	Potencial de entrada ( <i>Entrance potential</i> )
ESR	Velocidad de sedimentación de eritrocitos ( <i>Erythrocyte sedimentation rate</i> )
ESI	Ionización por electrospray ( <i>Electrospray ionization</i> )
EULAR	Liga Europea Contra el Reumatismo ( <i>European League Against Rheumatism</i> )
FA	Ácido fórmico ( <i>Formic Acid</i> )
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos ( <i>Food and Drug Administration</i> )
GSI	Fuente de iones en estado gaseoso ( <i>Ion Source Gas</i> )
IA	Iodoacetamida
IS	Voltaje ( <i>Ionspray voltaje</i> )
LC	Cromatografía líquida ( <i>Liquid chromatography</i> )
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz ( <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i> )
MRM	Monitorización de reacciones múltiples ( <i>Multi reaction monitoring</i> )



MS	Espectrometría de masas ( <i>Mass spectrometry</i> )
MW	Peso molecular ( <i>Molecular weight</i> )
NanoESI	Nanoelectrospray ( <i>Nano electrospray ionization</i> )
OA	Artrosis ( <i>Osteoarthritis</i> )
QQQ	Triple cuadrupolo
RF	Factor reumatoide ( <i>Rheumatoid factor</i> )
RT	Tiempo de retención ( <i>Retention time</i> )
SRM	Monitorización de reacciones simples ( <i>Single reaction monitoring</i> )
TFA	Ácido trifluoroacético ( <i>Trifluoroacetic acid</i> )
TIC	Corriente iónica total ( <i>Total ion current</i> )
TOF	Tiempo de vuelo ( <i>Time of light</i> )

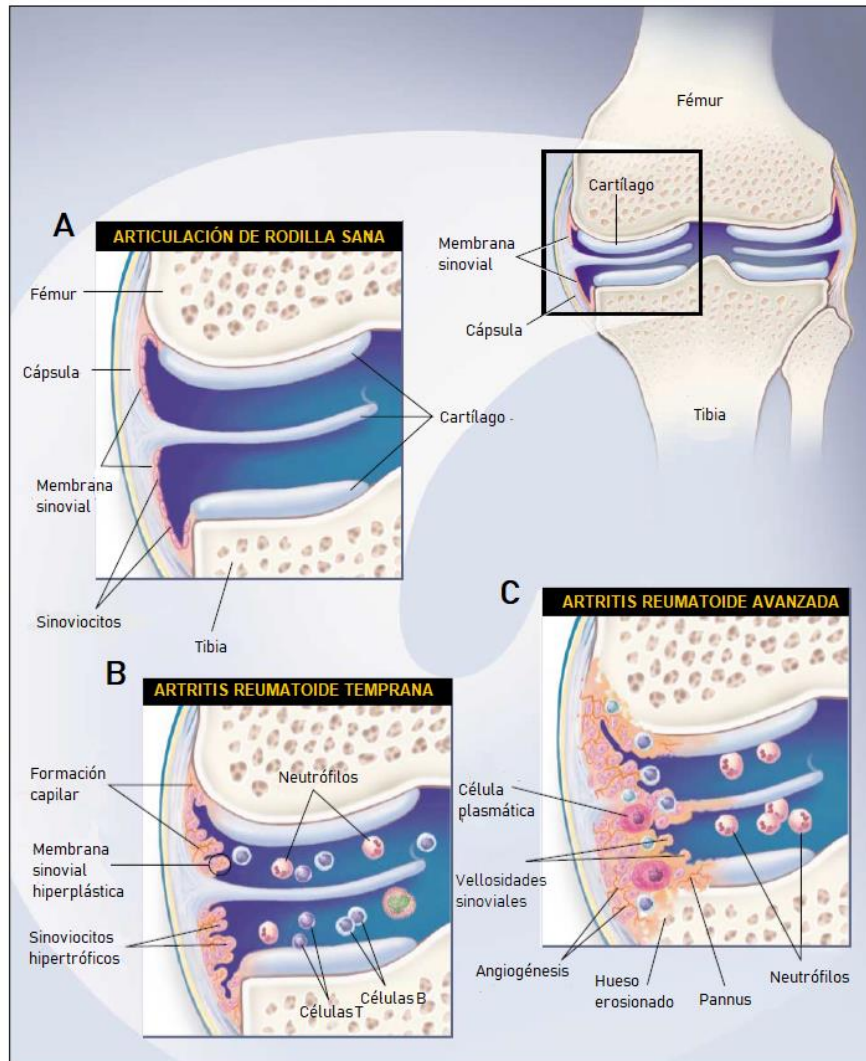
## **1. Introducción**

### **1.1. La artritis reumatoide**

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune inflamatoria crónica que afecta a las articulaciones (Lindstrom, 2010). Se caracteriza por destrucción del cartílago y del hueso y como consecuencia da lugar al impedimento de la realización de las actividades cotidianas, suponiendo altos costes personales, sociales y económicos (Choy, 2001). A nivel mundial, los trastornos osteoarticulares están presentes en un 10-40% de la población (Poley, 2011), siendo las enfermedades más comunes la artrosis u osteoartritis (OA) y la AR (Mateos, 2012). Esta última afecta aproximadamente a un 1% de la población (Chang, 2009). Actualmente, estas dos enfermedades reumáticas son las más estudiadas (Tilleman, 2008).

La AR es una enfermedad multifactorial, influenciada por la combinación de factores genéticos y ambientales. La posibilidad de que se herede es de hasta un 60% (Tobón, 2009), de forma que la genética puede adquirir un papel muy importante en cuanto al desarrollo de AR aunque no hay evidencias que confirmen que la genética difiera en cuanto a sexo, edad, edad de diagnóstico o gravedad (MacGregor, 2000).

A pesar de que la etiología de la AR no se conoce, se sabe que la destrucción de cartílago y hueso (Figura 1) característica de esta enfermedad, es provocada por células T activadas, macrófagos y otras células que penetran en la articulación y que estimulan una respuesta inmunitaria (Lorenz, 2003).



**Figura 1.** Desarrollo de la AR en una rodilla humana. Se muestran tres imágenes comparativas de una rodilla en condiciones normales (A), en los primeros estadios del desarrollo de la enfermedad (B) y en estado avanzado (C). Editado de Choy E. et al. (2001).

Otros factores que pueden influir en el desarrollo de AR son (Tobón, 2009):

- Socioeconómicos, afectando al curso de la enfermedad.
- Hormonales, siendo 2/3 más frecuente en mujeres que en hombres (Deane, 2017) debido a la menopausia por la estimulación del sistema inmune por los estrógenos, siendo la edad de diagnóstico más frecuente entre 40 y 60 años (Castro-Santos, 2015).

- Etnia, siendo alguna más propensa a desarrollar la enfermedad, debida a su situación geográfica, genética y medioambiente, por ejemplo, las comunidades romanas católicas de Brittany (Francia).
- Tabaquismo, estimulando la producción de factor reumático (RF) y antiproteínas citrulinadas (ACPA). A este último también se le denomina anticuerpo antipéptido cíclido citrulinado (anti-CCP) o antipéptidos citrulinados (ACP). Existen otros contaminantes que al inhalarlos inducen la inflamación de los pulmones, pudiendo también aumentar el riesgo de desarrollar AR.
- Infecciones, dado que se encontraron microorganismos influyentes en AR, como el virus de la rubeola y de la hepatitis B, micoplasma o E. Coli, entre otros.
- Dieta, siendo más propensas a padecer la enfermedad las personas que consumen pocos alimentos ricos en omega 3. El estudio de Crowson et al. (2013) indica que el incremento de casos de obesidad en los últimos años puede explicar el aumento en un 50% de la AR.

## **1.2. Diagnóstico y desarrollo de la enfermedad**

En la actualidad, a pesar de que la AR es una de las enfermedades reumáticas más estudiadas, no existe ningún mecanismo para el diagnóstico temprano de la misma, haciendo imposible el tratamiento de los pacientes desde las etapas iniciales para retrasar o frenar el avance de la enfermedad con una mayor efectividad (Lindstrom, 2010; Lourido, 2017). Por esto, la AR se detecta una vez ya ha comenzado el deterioro de las articulaciones y tejidos (Lindstrom, 2010), manifestándose principalmente en forma de dolor o inflamación (Smolik, 2013). Además, los síntomas no son iguales para todos los pacientes, ni tampoco lo es el deterioro del cartílago y hueso. Por ello, el avance de la enfermedad no es igual en todos los pacientes afectados (Lourido, 2017), por lo que el diagnóstico o tratamiento puede variar entre los diferentes casos.

Dado que la AR es una enfermedad inflamatoria sistémica, a parte del daño que sufren las articulaciones, también es frecuente su manifiesto en forma de afecciones en la piel, entre otros. De acuerdo con los estudios de Ziemer et al. (2015) y Turesson et al. (2003), la lesión cutánea más habitual asociada a la AR son los nódulos reumatoides, apareciendo más asiduamente en dedos y codos, aunque también existen casos en pies y manos. La vasculitis cutánea, el Síndrome de Sjögren, la queratoconjuntivitis seca o la fibrosis pulmonar son algunas de otras enfermedades que podrían derivar de la AR (Turesson, 2003).

El RF y los ACPA son anticuerpos, que, hoy en día, sirven como indicadores en sangre de posible presencia de AR, pero no existe ninguna prueba que garantice el diagnóstico de la enfermedad con absoluta certeza.

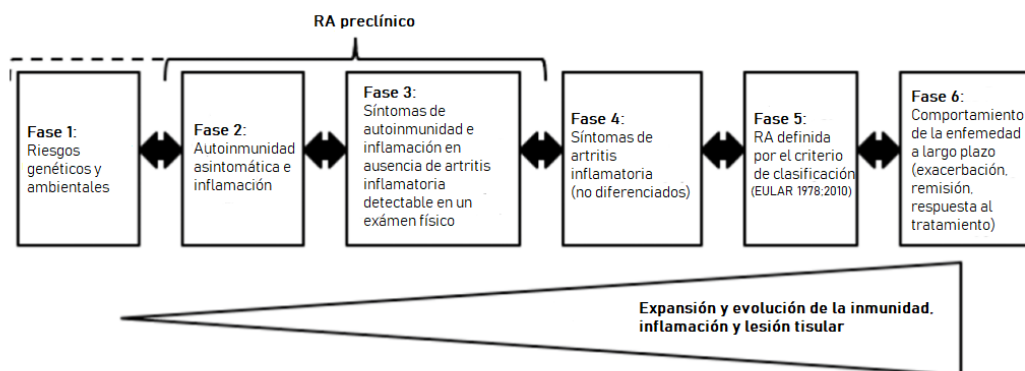
A pesar de que el papel del RF no está esclarecido, se relaciona con la unión de las células B con las inmunoglobulinas de superficie de los antígenos, teniendo una sensibilidad para el diagnóstico de AR de entre un 50 y 85%, pero con el inconveniente de que se puede detectar en pacientes con otras condiciones reumáticas (artrosis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante) (Lourido, 2017) u otras enfermedades (tiroiditis de Hashimoto, hepatitis). Además, solo el 50% de los casos de AR son positivos frente al RF y alrededor del 15% no muestra positividad aun padeciéndola (Colglazier, 2005).

Las ACPA están dirigidas contra péptidos y proteínas citrulinadas, es decir, que contienen citrulina en su composición. La citrulina es generada postraduccionalmente tras la modificación de otros aminoácidos (Gómez, 2004) y su generación está relacionada con procesos inflamatorios, provocando una respuesta inmunitaria ante las mismas (Kidd, 2008). En 1964 se describieron por primera vez los ACPA como factores específicos para el diagnóstico de AR, pero debido a las necesidades técnicas para su investigación no fueron estudiados hasta los últimos años (Colglazier, 2005). Su sensibilidad para la AR está en el mismo rango que el RF, pero su especificidad es mayor, entre un 96-98% (Kroot, 2000) tanto en estadios

tempranos como una vez la enfermedad está establecida (Colglazier, 2005).

La EULAR (European League Against Rheumatism) presentó en el 2010 una actualización de la clasificación de AR, con el fin de detectar si los síntomas que presenta un paciente son derivadas de AR o no, basándose en el número y tamaño de articulaciones afectadas, serología (RF/ACPA) duración de los síntomas y en la respuesta de fase aguda (APR). La APR se define como la actividad fisiopatológica que acompaña a la inflamación (Colglazier, 2005). Ésta última clasifica como normal o anormal la proteína C reactiva (CRP). Esta proteína aumenta su síntesis durante la APR (Colglazier, 2005), al igual que aumenta la velocidad de sedimentación de los eritrocitos (ESR) (Colglazier, 2005; Aletaha, 2018). Nuevamente, esta clasificación solo tiene aplicabilidad una vez estén presentes los primeros síntomas de la enfermedad, es decir, cuando el deterioro ya ha empezado.

Deane (2013), propone un modelo sencillo de seis fases (Figura 2) diferenciadas que representan el desarrollo de la enfermedad.



**Figura 2.** Esquema del desarrollo de AR. Editado de Deane K. et al. (2013).

En el esquema presentado podríamos agrupar las fases en tres partes. La primera (fase 1), está formada por el conjunto de factores genéticos y ambientales que pueden influir en el desarrollo de la enfermedad. La segunda (fase 2 y 3), por los primeros daños e inflamación asintomáticos que con el avance de la enfermedad pueden detectarse. Por último, la

tercera (fase 4, 5 y 6) corresponde al desarrollo avanzado de la AR y a las manifestaciones de ésta. En este punto también se puede aplicar la clasificación de la EULAR y estudiar el grado de la enfermedad para llevar a cabo un tratamiento adecuado.

### **1.3. Tratamiento**

Como ya se ha expuesto anteriormente, en la actualidad no existen técnicas que garanticen la detección de la AR de una forma prematura que permita tratar a los pacientes para prevenir el desarrollo de la enfermedad. Según el estudio de Poley et al. (2011) los fármacos más frecuentemente utilizados en el tratamiento de la enfermedad son los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), analgésicos, opiáceos y en algunos casos los pacientes reciben infiltraciones. A pesar de que esto puede calmar los síntomas (dolor, rigidez, inflamación del tejido y articulaciones), la calidad de vida de los pacientes empeora a medida que la enfermedad avanza (Poley, 2011). Además, en muchos de los casos se necesita algún tipo de operación menor o el reemplazo completo de la articulación por una prótesis (Kapetanovic, 2008). Debido a esta ausencia, es de gran importancia la investigación y la búsqueda de biomarcadores u otros indicadores que permitan la detección precoz de la AR. La proteómica es una opción para la búsqueda de biomarcadores proteicos que permitan la detección temprana de enfermedades heterogéneas como es el caso de la AR (Castro-Santos, 2015).

### **1.4. Proteómica en la búsqueda de biomarcadores y en la investigación de artritis reumatoide**

El proteoma es el conjunto de proteínas presentes en una célula y presenta un dinamismo concreto en función de cada célula y el estado de ésta (Apweiler, 2009). La proteómica es la ciencia que se encarga del estudio del proteoma (Bermúdez-Crespo, 2007), y consiste en el estudio de las proteínas a gran escala, incluyendo sus estructuras, diversas funciones

e interacciones (Ruiz-Romero, 2013). La complejidad de las proteínas dificulta mucho su análisis y estudio (Pando-Robles, 2009). Por ello, las técnicas proteómicas cada vez son más usadas en la biomedicina para la búsqueda de biomarcadores en diferentes enfermedades (Bermúdez-Crespo, 2007).

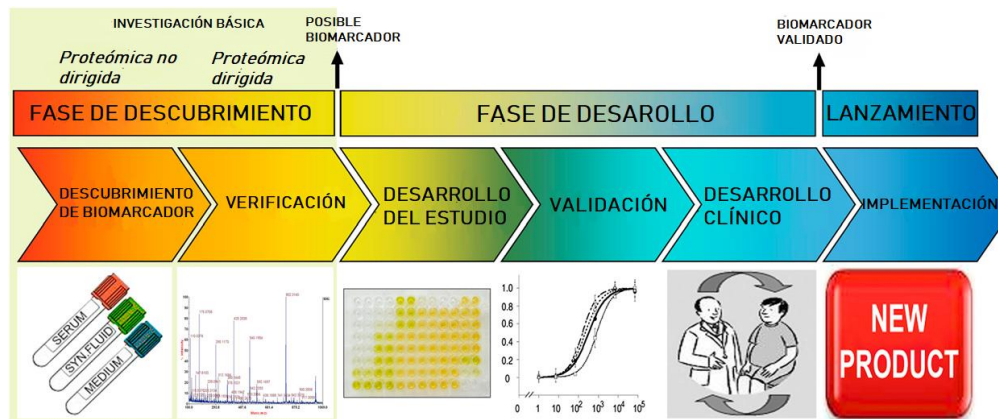
Un biomarcador es una sustancia indicadora de un estado biológico (Ruiz-Romero, 2013). Es un indicador cuantificable, por tanto, informa de la posible presencia de una enfermedad o del estado de desarrollo de la misma (Rifai, 2006). Una característica indispensable que ha de tener un biomarcador es la especificidad, como en el caso de los indicadores para la AR, que han de ser capaces de discriminarla de otras enfermedades reumáticas similares como puede ser la OA (Tilleman, 2008). Es muy importante también su sensibilidad, rentabilidad, rapidez de detección y que sea innovador frente a lo ya existente (Ludwig, 2005).

La búsqueda y descubrimiento de nuevos biomarcadores es imprescindible para un mejor conocimiento de la AR en términos moleculares (Lorenz, 2003), para entender su funcionamiento y su desarrollo, además de permitir la detección precoz y la posibilidad de aplicar un tratamiento en las etapas iniciales de la enfermedad. Asimismo, dado que las proteínas son macromoléculas diana en la industria de las drogas, la identificación de nuevos biomarcadores proteicos puede contribuir al desarrollo de medicamentos novedosos que beneficien a los pacientes (Bermúdez-Crespo, 2007).

Los biomarcadores, desde que se detectan hasta que pueden ser utilizados en la clínica, tienen que ser sometidos a una serie de pruebas y finalmente ser validados por la FDA (Food and Drug Administration) (Pando-Robles, 2009). Son cinco las fases por las que ha de pasar un biomarcador antes de poder utilizarse como tal: estudios preclínicos exploratorios, ensayos clínicos y validación, estudios retrospectivos longitudinales, estudios prospectivos y estudios control. Estas fases han sido propuestas en el estudio de Barker (2003) sobre biomarcadores de



cáncer. Ruiz-Romero et al. (2010) presentan un esquema (Figura 3) sencillo de las fases de la búsqueda de biomarcadores, desde la fase de investigación básica y descubrimiento hasta su lanzamiento al mercado una vez cumplen todos los requisitos necesarios.



**Figura 3.** Flujo de desarrollo de biomarcadores. Editado de Ruiz-Romero et al. (2010).

En la fase de descubrimiento se combina el uso de proteómica al azar (no dirigida) con la proteómica dirigida con el fin de detectar y verificar posibles biomarcadores. En la fase siguiente se desarrollan los métodos que permiten validar los biomarcadores previamente verificados con el fin de llevarlos a la práctica clínica.

Los estudios que relacionan la proteómica con la AR se centran en la identificación de proteínas específicas mediante el análisis de fluidos biológicos o tejidos reumáticos y el estudio de autoantígenos (Tilleman, 2008; Lourido, 2017).

Debido a su fácil obtención, los fluidos biológicos como el suero (fracción de la sangre que se obtiene después de la coagulación y centrifugación de la misma (Fernández-Irigoyen, 2014)), entre otros, resultan muy atractivos para la investigación en comparación con las biopsias o los tejidos, siendo muy empleados para la búsqueda de biomarcadores proteicos (Wither, 2016). Los inconvenientes que presentan los fluidos son su complejidad y el amplio rango dinámico en cuanto a las proteínas presentes (Hortin,

2006), además de la necesidad de una recogida, transporte, almacenamiento y preparación muy estrictos para evitar su alteración (Fernández-Irigoyen, 2014).

La ventaja de la aplicación de la proteómica es que ofrece a la posibilidad del análisis de un gran número de proteínas simultáneamente dentro de la misma muestra (Pando-Robles, 2009), lo que facilita y acelera el proceso de identificación de biomarcadores factibles.

La introducción de la proteómica en la medicina sirve como un complemento a otras ciencias como la citómica, genómica, metabolómica, lipidómica, glicómica y transcriptómica (Apweiler, 2009).

### **1.5. Estrategias proteómicas**

Existen dos tipos de estrategias proteómicas, la proteómica al azar y la proteómica dirigida. En la proteómica al azar se detectan todas las proteínas en una muestra, mientras que la proteómica dirigida sirve para analizar y verificar de forma específica proteínas concretas que puedan ser posibles biomarcadores.

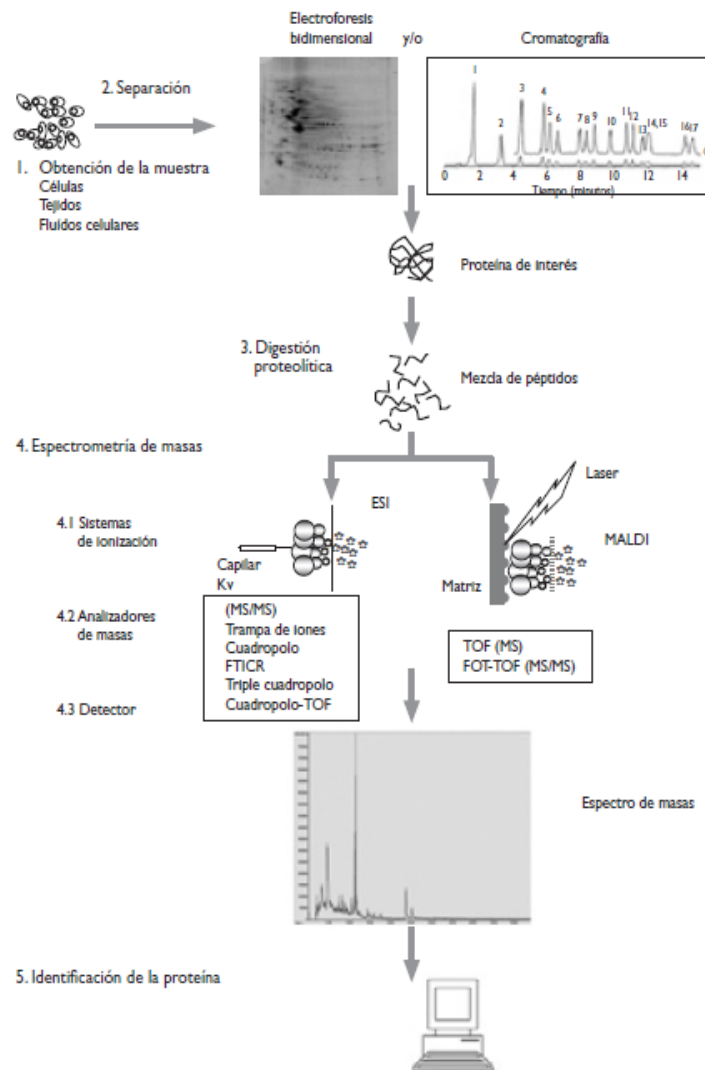
Dada la complejidad de las muestras biológicas como los sueros o el líquido sinovial, para poder identificar el mayor número de proteínas es necesario llevar a cabo diferentes pre-tratamientos de las muestras, como la separación de proteínas, y la digestión de éstas con enzimas como la tripsina (Figura 4), para obtener sus péptidos y poder llevar a cabo su separación e identificación.

La separación de proteínas o péptidos se puede realizar mediante diferentes métodos. Uno de los más antiguos es la electroforesis en gel y se realiza en geles de poliacrilamida monodimensionales o bidimensionales (2-DE). En el caso de los geles monodimensionales, las proteínas se separan según su peso molecular y en los bidimensionales se separan

primero en función de su punto isoeléctrico y después por su peso molecular (Ruiz-Romero, 2013).

Otros métodos son la precipitación con solventes de diferentes polaridades o la inmunodepleción de las proteínas más abundantes como albúmina y IgG (65% y 15 % respectivamente de las proteínas totales en el suero), con el fin de separar las proteínas mayoritarias de las minoritarias. De esta forma, se pueden detectar más fácilmente las proteínas en menor concentración, que normalmente son más específicas y más interesantes para el estudio de las enfermedades.

Además, la separación puede realizarse mediante cromatografía líquida (LC), la cual se compone de una fase estacionaria, formada por un sólido contenido en una columna, y de una fase móvil líquida. Las proteínas en la fase estacionaria pueden separarse mediante diferentes tipos de cromatografía, como la de exclusión molecular, de intercambio iónico, de afinidad o de fase reversa. En la cromatografía de exclusión molecular, la fase estacionaria es un gel poroso en el que las moléculas pequeñas se quedan atrapadas, eluyendo en primer lugar las más grandes. En la separación por cromatografía de intercambio iónico, es determinante la carga de las proteínas y eluyen primero las menos cargadas, mientras que en la cromatografía por afinidad las proteínas se separan por afinidad al ligando de la fase estacionaria. En este estudio, la separación de proteínas se lleva a cabo por cromatografía en fase reversa. La fase estacionaria es apolar (C18) y la móvil polar, dando lugar a que los componentes más polares eluyan primero, y los menos polares después (Lourido, 2015) al aplicar un gradiente de agua y acetonitrilo como fase móvil.



**Figura 4.** Diagrama de flujo de un análisis proteómico utilizando técnicas de separación en gel o cromatografía y técnicas de detección por espectrometría de masas. Pando RV et al. (2009).

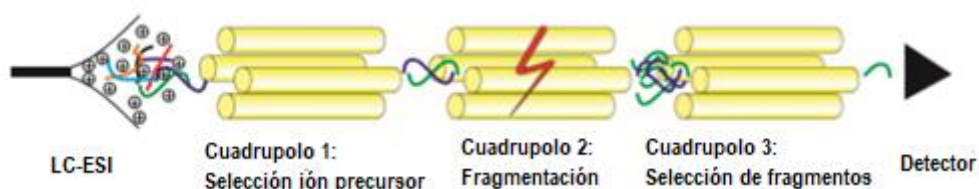
Después de la separación de las proteínas o péptidos por LC o gel, la tecnología principal de detección utilizada es la espectrometría de masas (MS) (Rifai, 2006), debido a su grado de afinidad y especificidad para la identificación y cuantificación de estas macromoléculas (Figura 4). La MS consiste en la ionización de los péptidos, separación de sus iones y detección de la señal emitida que es correspondiente a la relación masa/carga ( $m/z$ ) de los mismos (Ruiz-Romero, 2013).

Los equipos de espectrometría de masas (Figura 4) están formados por tres componentes principales (Lourido, 2015):

- Fuente de ionización, con el fin de ionizar las moléculas de la muestra. Las más usadas en proteómica son MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) y ESI (electrospray).
- Analizador, compuesto por un filtro que separa los iones en función de su relación  $m/z$ . Los tipos de analizadores más comunes son: de doble enfoque, time of flight (TOF), cuadrupolos de transmisión, trampas de iones, Orbitrap y espectrometría de masas transformada de Fourier (Gelpí, 2014).
- Detector, que detecta los iones en función de su relación  $m/z$ .

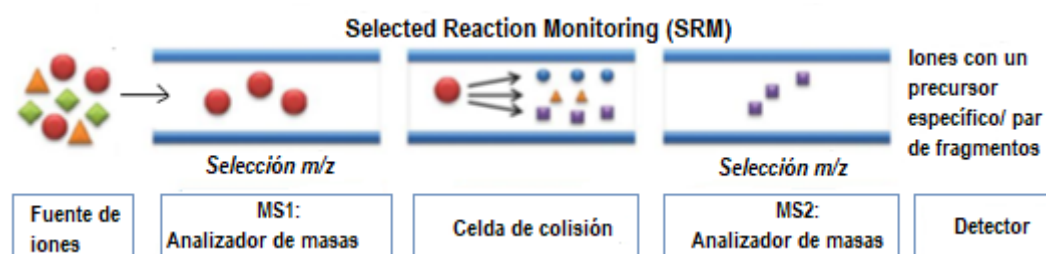
En este trabajo se utiliza la proteómica dirigida para seleccionar los parámetros que permiten analizar los péptidos de unas proteínas concretas. Para ello, se utiliza un espectrómetro de masas con una fuente de ionización de tipo nano electrospray (nanoESI) y un analizador de masas de tipo triple cuadrupolo (QQQ) en modo MRM (multi reaction monitoring).

El nanoESI se caracteriza por trabajar con un flujo de orden de nanolitros pero actúa igual que el ESI, aplicando un voltaje que ioniza las moléculas y permite que sus iones penetren en el analizador. Éste último está formado por tres cuadrupolos, cada uno de ellos formado por cuatro barras dispuestas en paralelo con la misma distancia entre ellas (Figura 5), por la que se transmiten los iones cuando se aplica la corriente (Lourido, 2015).



**Figura 5.** Esquema de un análisis SRM/MRM con un triple cuadrupolo, desde la ionización hasta la detección. Editado de Lange V et al. (2008).

El primer y tercer cuadrupolo (Q1 y Q3) actúan como filtros (Figura 6), mientras el segundo (Q2) actúa como celda de colisión (Gallien, 2011). Los iones entran al Q1, donde se seleccionan los péptidos de una  $m/z$  concreta (iones precursores), eliminando al resto (iones no resonantes). En el Q2, los péptidos seleccionados se disocian gracias a la energía recibida por el choque con un gas (nitrógeno) y los productos (fragmentos) con una  $m/z$  determinada de éstos entran en el Q3 donde son detectados, y seleccionados obteniendo pares de iones precursores con sus fragmentos correspondientes. La pareja de valores  $m/z$  del precursor y de sus fragmentos se conoce como transición (precursor/fragmento del precursor).



**Figura 6.** Funcionamiento del triple cuadrupolo en un análisis SRM. Editado de Hinterwirth H. et al (2014).

La MS ofrece trabajar en modo Single Reaction Monitoring (SRM) o Multi Reaction Monitoring (MRM), en función de si estudia la transición de un solo precursor o varias simultáneamente (Gallien, 2011). La palabra múltiple hace referencia a la capacidad de monitorizar al mismo tiempo un gran número de transiciones para el mismo péptido o múltiples péptidos con sus correspondientes transiciones. Por la especificidad, sensibilidad y rango dinámico que ofrece, la MRM se está utilizando mucho en la proteómica cuantitativa, dado que permite una cuantificación absoluta y precisa de una manera reproducible de un gran número de proteínas o péptidos de forma simultánea (Lange, 2008; Fernández-Puente, 2017).

## 1.6. Cuantificación de los péptidos y proteínas

La cuantificación de las proteínas se puede llevar a cabo de dos formas, por el método del estándar externo o estándar interno. Para el estándar externo es necesaria una curva de calibración con estándares de concentraciones conocidas, en la que se extrapolan las señales de los analitos a estudiar, pudiendo cuantificar así sus concentraciones. En el caso del estándar interno, se añade a la muestra un estándar de concentración conocida.

En este estudio, se realiza una cuantificación relativa utilizando el método del estándar interno. Se utilizan como estándar unos péptidos sintéticos marcados isotópicamente ( $C^{13}/N^{15}$ ), que solo se diferencian de los de la propia muestra en la relación  $m/z$ , por lo que en la cromatografía sus picos serán coincidentes, coeluyendo a un mismo tiempo de retención (RT). El tiempo de retención se entiende como el tiempo que transcurre desde la inyección de la mezcla hasta que un soluto dado alcanza el detector. Esto asegura la detección y cuantificación del péptido de interés. De esta forma se puede comparar la intensidad de los picos de los péptidos sintéticos (heavy) con la de los presentes en la propia muestra (light). A partir de la concentración conocida del péptido estándar se extrapola la del péptido endógeno presente en la muestra analizada.

## 2. Objetivos

Los ensayos llevados a cabo en este trabajo se basan en estudios anteriores realizados por el grupo de proteómica del INIBIC (Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña). En el trabajo realizado por Calamia y colaboradores se utilizaron muestras de suero de pacientes con AR agrupadas en pools y se identificaron ciertas proteínas con tendencia a estar moduladas en las diferentes condiciones de la enfermedad (RF+/ACPA+, RF+/ACPA-, RF-/ACPA+) frente a un control (RF-/ACPA-) mediante proteómica al azar. De este análisis se seleccionaron las proteínas y péptidos (Anexo II) como posibles biomarcadores de la enfermedad para realizar este estudio.

El objetivo principal es la aplicación de una estrategia de proteómica dirigida basada en la técnica MRM, para detectar, cuantificar y verificar un posible panel de biomarcadores relacionados con la AR.

Para poder llevar a cabo el objetivo principal se plantea lo siguiente:

- Desarrollo del método MRM con las proteínas identificadas previamente como posibles biomarcadores;
- Aplicación del método MRM optimizado usando péptidos marcados isotópicamente como estándares internos para normalizar los datos;
- Análisis de los datos y análisis estadístico de los mismos mediante el programa Skyline® y Prism®;
- Cuantificación relativa de las proteínas de interés en las distintas condiciones de estudio.



### **3. Material y métodos**

#### **3.1. Muestras**

Para el siguiente estudio se dispone de 80 muestras de suero obtenidas del grupo de reumatología del Centro Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS). Están clasificadas en función de su presencia/ausencia de RF y ACPA de la siguiente manera: 20 muestras RF+/ACPA+, 20 muestras RF+/ACPA-, 20 muestras RF-/ACPA+, y 20 muestras RF-/ACPA-, la cuales ejercen como control. En la tabla del anexo I, se indican los datos de edad y sexo para cada una de las muestras de cada grupo.

##### **3.1.1. Cuantificación de la muestra**

- Se descongela y homogeniza la muestra de suero mediante agitación en vórtex (10 minutos) y sonicación (3 minutos).
- Se mide la concentración de proteína del suero (45-70  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) en el NanoDrop® a una longitud de onda de 280 nm.
- Se calcula el volumen necesario de la misma que contenga 100  $\mu\text{g}$  de proteína total y se lleva a un volumen final de 20  $\mu\text{L}$  de Urea 6 M/Tiourea 2 M con el fin de conseguir que la concentración final de proteína total sea de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- Se pone en un Eppendorf Protein LoBind de 1.5 mL, 2  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{g}$ ) de suero para empezar con el protocolo de digestión.

##### **3.1.2. Digestión de la muestra**

- Se añade al Eppendorf que contiene los 10  $\mu\text{g}$  de suero:
  - 3  $\mu\text{L}$  de bicarbonato amónico (BA) 25 mM (Sigma-Aldrich).
  - 1.25  $\mu\text{L}$  de Ditioneitol (DTT) 50 mM (Sigma-Aldrich). El DTT es un agente reductor, y tiene como fin la reducción de los enlaces disulfuro de las proteínas (-S-S-) a grupos sulfhidrilo (-SH) para permitir que la proteína se despliegue. En este

momento la concentración final es de 10 mM. Se incuba una hora a 37°C.

- Se añaden 6.5 µL de Iodoacetamida (IA) 100 mM (Sigma-Aldrich). La Iodoacetamida es un agente alquilante, y tiene como función el bloqueo de los grupos sulfhidrilo para evitar que se oxiden y se formen de nuevo los enlaces disulfuro, manteniendo así la proteína desplegada. Se incuba 45 minutos en oscuridad dado que la IA es fotosensible. En el momento de la alquilación la concentración es de 50 mM.
- Se añaden 10 µL de BA, con el fin de que la concentración de urea se encuentre por debajo de 1 M y para la alcalinización del medio, lo que permitirá el funcionamiento óptimo de la enzima tripsina.
- Se añaden 0.5 µL de tripsina (1 µg/µL), de forma que tenemos una relación enzima:proteína 1:20 y se incuba a una temperatura de 37°C durante toda la noche.
- Se termina la reacción enzimática de digestión mediante la acidificación del medio añadiendo 10 µL de ácido trifluoroacético (TFA) al 2% (Sigma-Aldrich).

### **3.1.3. Péptidos sintéticos**

- Se añaden 10 µL de péptidos sintéticos (JTP Frickenhausen, Germany) de una disolución stock con las concentraciones aproximadas de cada péptido indicadas en la tabla I. Los péptidos están isotópicamente marcados (heavy, estándar) en los C<sup>13</sup>/N<sup>15</sup> de los aminoácidos arginina (+ 10 Da) o lisina (+ 8 Da).
- Se agita la muestra durante 5-10 minutos, se sonica 3-5 minutos, y se procede a la limpieza con Stage-Tips.

**Tabla I.** Concentración de los péptidos sintéticos en la disolución stock.

<b>Proteína</b>	<b>Péptido</b>	<b>Concentración [fmol/<math>\mu</math>L]</b>
1	ALG	50
1	DLL	25
4	WEL	250
4	EAQ	100
4	VIP	250
5	LLN	250
5	YWG	100
6	HLS	250
6	VLE	100
6	YTF	100
7	YVG	250
7	EQL	250
7	SDV	250
8	EHV	250
8	SDV	250
9	EIG	250
9	AVL	250
10	VGY	250
10	VTS	250

#### **3.1.4. Limpieza de sales con Stage-Tips**

El suero contiene sales, las cuales, si no se eliminan, pueden provocar la obstrucción del capilar del sistema nanoLC acoplado al espectrómetro de masas e interferir en el análisis de las proteínas (Wither, 2016). Para llevar a cabo la limpieza de sales se realiza una limpieza con filtros de C18 (2xC18, 47mm, Empore, Sigma-Aldrich).

❖ Preparación del filtro:

- Se limpian las tijeras con etanol, se agujerea la tapa del Eppendorf (DNA LoBind 2 mL) y se coloca una punta de 200  $\mu$ L (Eppendorf).
- Con el sacabocados se corta el filtro y se coloca en el interior de la punta.

❖ Acondicionamiento del filtro:

Con la ayuda de una centrífuga, se pasan los reactivos por el filtro a 3000-4000 revoluciones durante 2-3 minutos.

- Se añaden por duplicado 50  $\mu$ L de metanol (Thermofisher).
- Se añade por duplicado una disolución de 50  $\mu$ L de acetonitrilo (ACN) al 80% (Thermofisher), TFA 0.5%.
- Se añaden por triplicado 50  $\mu$ L de TFA 0.5% y se recoge el deshecho acumulado en el Eppendorf.

❖ Filtrado de la muestra y limpieza de la misma:

- Se pasa la muestra (43.25  $\mu$ L) dos veces por el filtro y a continuación, se deshecha lo acumulado.
- Se realiza un lavado con 50  $\mu$ L de TFA 0.5 % y dos lavados con 50  $\mu$ L de ácido fórmico (FA) al 0.5 % (Thermofisher).

❖ Elución de la muestra:

- Se hacen dos eluciones con 30  $\mu$ L de una disolución de ACN 80% FA 0.5%, con la ayuda de una jeringuilla y se recoge en un Eppendorf Protein LoBind 0.5 mL.
- Se seca la muestra en la Speed-Vac (Thermo-Scientific) sin temperatura.

### **3.2. Nano-cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con la tecnología de triple cuadrupolo en modo MRM (nano-LC-MRM)**

Las muestras digeridas, limpias y secas se resuspenden en 20  $\mu$ L de fase móvil A, la cual se compone de una disolución acuosa, ACN 2%, FA 0.1% y se traspasa a un vial de propileno (Agilent Technologies) apto para el

autosampler (automuestreador) y la posterior inyección (2  $\mu$ L) en el sistema cromatográfico nanoLC (Sciex). Las muestras se analizaron por duplicado. La mezcla de péptidos se separa en el nanoLC (Figura 7), equipado con una precolumna TRAP, Acclaim pepmap 100A nanoviper (C18 de 100 $\mu$ m x 2cm y 5  $\mu$ m de partícula) y una columna Acclaim pepmap (100A C18 de 75 $\mu$ m x 15cm y 5  $\mu$ m de partícula). El flujo es de 300 nL/min y los péptidos eluyen con el gradiente mostrado en la tabla II.

**Tabla II.** Parámetros del gradiente cromatográfico utilizado. % A: H<sub>2</sub>O 98%, ACN 2%, FA 0.1%. % B: H<sub>2</sub>O 5%, ACN 95%, FA 0.1%

Tiempo (min)	% A	% B
0	95	5
5	85	15
45	65	35
46	5	95
56	5	95
57	95	5
70	95	5

El sistema de separación cromatográfica nanoLC está acoplado al espectrómetro de masas de triple cuadrupolo 5500 QTrap (Sciex) (Figura 7) con una fuente iónica nanospray que aplica un voltaje (IS) de 2600 V. Los parámetros del espectrómetro de masas son los siguientes: la temperatura de la fuente es de 150°C, gas cortina (Cur) 30 Bar y fuente de iones (GSI) 25 Bar. El potencial de entrada (EP) que permite la entrada de los iones es de 10 V y el potencial de salida de la celda de colisión (CXP) de 15 V. Se trabaja en polaridad positiva y tanto la resolución de Q1 como del Q2 está fijada a la unidad.



**Figura 7.** Sistema cromatográfico nano LC (Sciex) acoplado a un espectrómetro de masas 5500 QTRAP (Sciex).

### **3.3. Análisis de datos**

Skyline 3.1® (Mac Coss Lab, <https://skyline.ms>) es un programa informático gratuito de Windows que permite el análisis de datos de experimentos de proteómica dirigida usando la técnica MRM. El programa, conociendo la secuencia aminoacídica de cada una de las proteínas de estudio, permite la selección de sus péptidos proteotípicos y de las mejores transiciones de los mismos para posteriormente desarrollar el método MRM. Para su uso no es necesaria la conversión de archivos a otros formatos, permitiendo que la lectura, procesamiento e intercambio de información sea más rápido, acelerando el proceso de análisis, ya que pueden exportarse directamente los datos a programas estadísticos como Excel o R (MacLean, 2010). Skyline® permite integrar los picos cromatográficos permitiendo la obtención de la relación de áreas entre el

péptido endógeno y el sintético para normalizar los datos de cada una de las muestras respecto a su estándar.

En este estudio, los datos se exportaron a Excel para su posterior análisis. Estas ventajas y facilidades hacen de Skyline® un programa ampliamente utilizado para este tipo de análisis.

Para el análisis estadístico se hizo uso del programa Prism 7®. Se aplicó el test de Mann-Whitney con el fin de detectar las diferencias existentes entre los péptidos de cada condición (RF+/ACPA+, RF+/ACPA- y RF-/ACPA+) frente al control (RF-/ACPA-).

### 3.4. Cuantificación

El método del estándar interno se usó para determinar la concentración de las proteínas de estudio en muestras de suero de pacientes diagnosticados con AR.

La concentración de los péptidos sintéticos (Tabla I) que se añaden a cada una de las muestras de acuerdo con lo descrito en material y métodos permite conocer la concentración de los péptidos endógenos, y, por tanto, la de la proteína de estudio. El cálculo de la concentración de cada una de las proteínas se lleva a cabo mediante la fórmula siguiente:

$$C_L = \frac{\frac{A_L}{A_H} \times C_H \times MW \times F_{dil}}{V_i}$$

Dónde:

- $C_L$ : concentración de la proteína de estudio (fg/μg)
- $A_L/A_H$ : área del ratio light/heavy
- $C_H$ : concentración péptido heavy (fmol/μL)
- $MW$ : peso molecular de la proteína (g/mol)
- $F_{dil}$ : factor de dilución
- $V_i$ : volumen de suero inicial (μL)

#### 4. Resultados y discusión

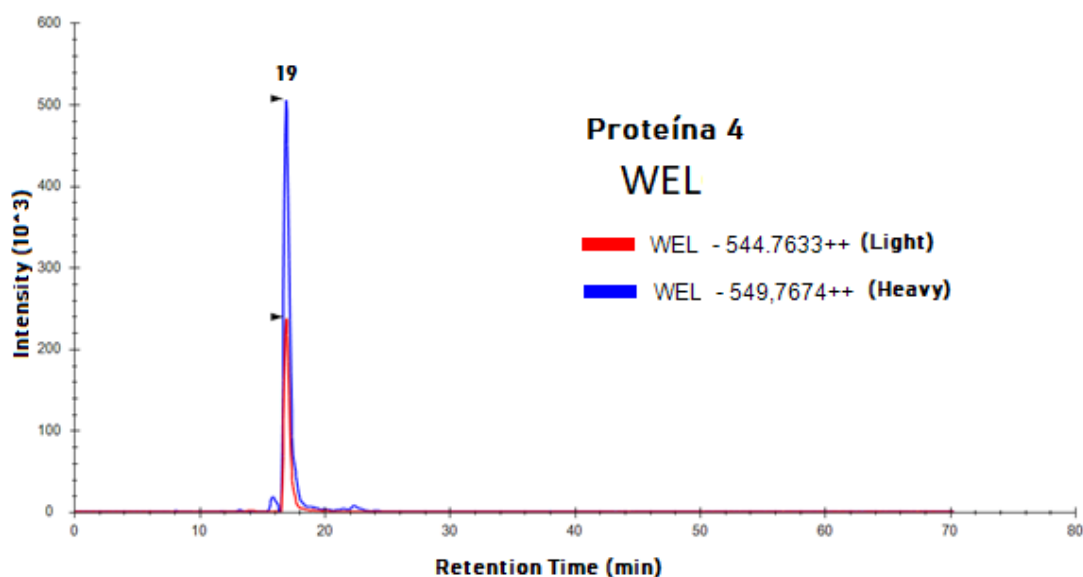
Se analizaron por duplicado 80 muestras de pacientes con artritis reumatoide agrupadas en cuatro condiciones diferentes en función de la presencia y/o ausencia de RF y ACPA en cada una de ellas (RF+/ACPA+, RF+/ACPA- y RF-/ACPA+), con el fin de poder identificar proteínas alteradas en las condiciones descritas, apareciendo moduladas en comparación con el control (RF-/ACPA-). Las proteínas y péptidos a analizar han sido previamente identificadas mediante un estudio de proteómica al azar en pools de suero y están indicadas en la tabla del Anexo II.

Una vez seleccionadas las proteínas se eligieron 26 péptidos trípticos proteotípicos, específicos de cada proteína. Con el programa Skyline se desarrolló el método MRM con el que se seleccionaron las mejores transiciones (Anexo II) para cada uno de los péptidos, tanto endógenos como estándar. Para cada proteína se seleccionaron 2 o 3 péptidos y para cada uno de éstos se monitorizaron 3 transiciones que permiten la identificación inequívoca y específica de los mismos. En total, se monitorizaron mediante MRM 10 proteínas, 26 péptidos y 156 transiciones.

Para la cuantificación relativa de estos péptidos en las distintas condiciones de estudio se utilizó el método del estándar interno. Por lo tanto, se utilizaron 26 péptidos marcados isotópicamente. El péptido estándar y el endógeno son exactamente el mismo, por lo que tienen las mismas características fisicoquímicas y van a coeluir al mismo tiempo de retención en el cromatograma. Los péptidos se podrán diferenciar únicamente por la relación masa/carga ( $m/z$ ), dado que el estándar tiene una arginina o una lisina marcadas isotópicamente, dando lugar a una diferencia de masa de 10 Da y 8 Da respectivamente (Le Blanc, 2017). De esta forma se garantiza la unicidad, especificidad y selectividad de la identificación del péptido diana y, por tanto, de la proteína.



A parte del desarrollo del método MRM, Skyline® permite el análisis de los datos para la identificación y cuantificación de las proteínas diana comprobando la coelución perfecta de las transiciones de los péptidos estándar marcados isotópicamente y los péptidos endógenos correspondientes en la muestra, como se muestra en la figura 8.

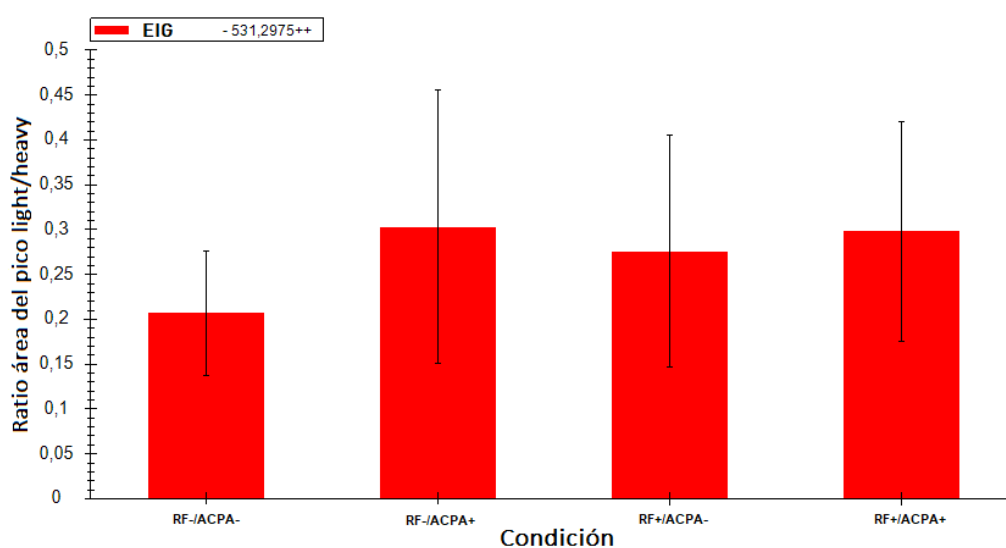


**Figura 8.** Cromatograma del péptido WEL de la proteína 4. El péptido endógeno (light) aparece representado en rojo y el sintético (heavy) en azul. Se presenta la coelución perfecta de los dos picos a un tiempo de retención de 19 minutos.

En esta figura se muestra para el péptido WEL de la proteína 4, la coelución perfecta del péptido endógeno (rojo, 544.76 m/z) y del péptido isotópicamente marcado (azul; 549.76 m/z) representado en abscisas el RT y en las ordenadas la corriente iónica total (TIC) del pico. Este cromatograma se genera para cada uno de los péptidos de cada una de las proteínas monitorizadas.

Skyline® también permite representar la diferencia de la expresión de un péptido concreto entre las condiciones de estudio con la generación de un gráfico (Figura 9) que compare cada una de las condiciones frente al ratio del área del pico del péptido endógeno frente al estándar (área light/heavy).

En este gráfico, las barras representan la media de todas las muestras y sus réplicas para un mismo péptido (en este caso, EIG) de la misma condición, y la desviación estándar. Este programa resulta muy útil para el análisis de datos y la cuantificación de proteínas en experimentos de SRM/MRM con estándares internos marcados, ya que ofrece la posibilidad de visualizar los resultados de una forma muy gráfica (MacLean, 2010).



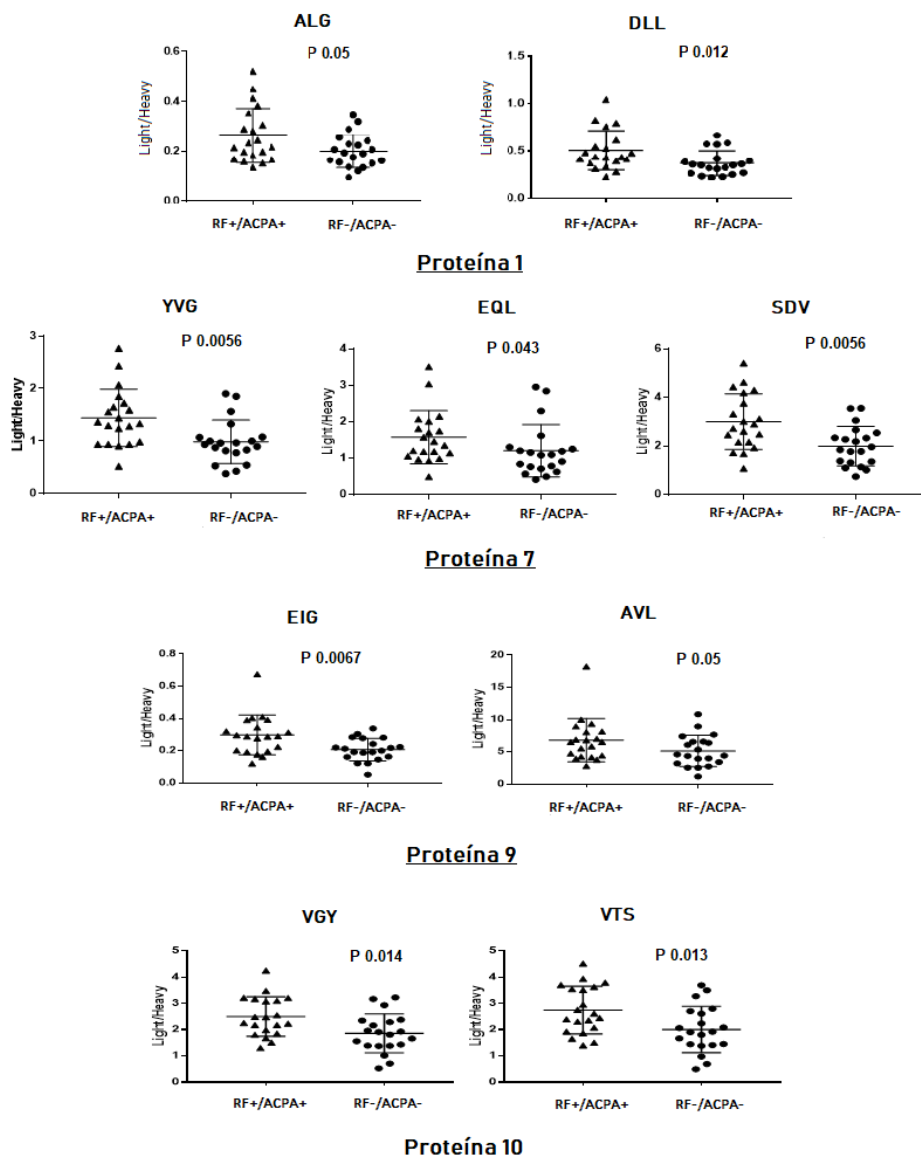
**Figura 9.** Representación de las medias de las áreas light/heavy para el péptido EIG en todas las condiciones de estudio: RF-/ACPA-, RF-/ACPA+, RF+/ACPA-, RF+/ACPA+ con su desviación estándar.

Entre las cuatro condiciones, la condición RF-/ACPA- se utiliza como control, dado que los pacientes seronegativos con diagnóstico de AR conforman un porcentaje muy bajo, siendo en su mayoría pacientes sanos. Además, los pacientes con esta condición presentarán a largo plazo daños menores que los seropositivos solo para RF y estos a su vez menor daño que los diagnosticados con ACPA positivo (Kroot, 2000), por lo que consideramos que los pacientes seronegativos para ambos marcadores tienen un grado menor de enfermedad.

Los datos obtenidos en este estudio se analizaron con el programa Prism 7<sup>®</sup> con el test estadístico de Mann-Whitney. Se identificaron varios péptidos que muestran una modulación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) como

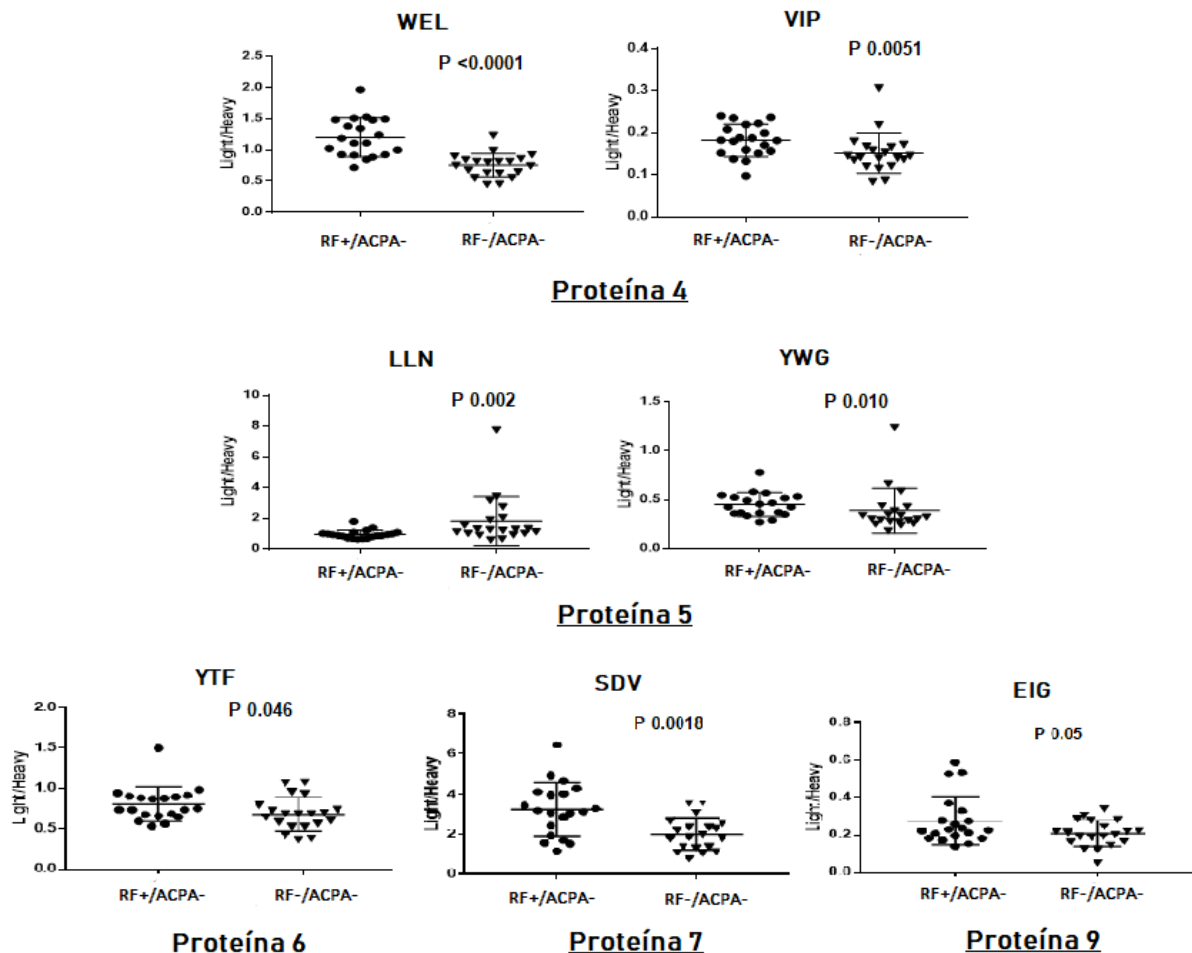
se indica en las figuras 10, 11 y 12. En todas las figuras se representa el ratio del área del péptido endógeno frente al área su estándar en relación a las condiciones de estudio.

En la figura 10, se representa la comparación de la condición RF+/ACPA+, frente al control (RF-/ACPA-). 9 péptidos, pertenecientes a las proteínas 1, 7, 9 y 10, están aumentados significativamente en RF+/ACPA+.



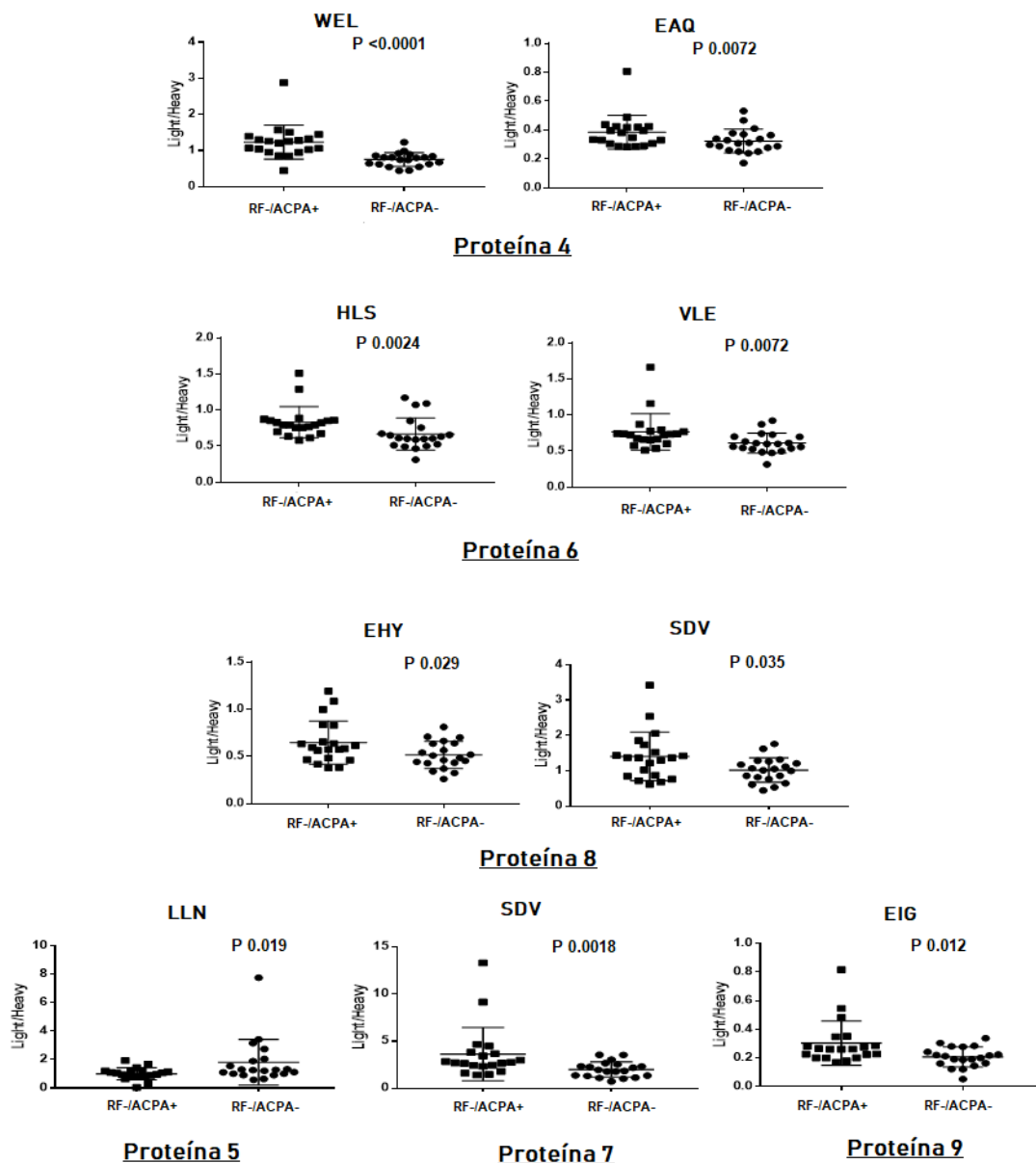
**Figura 10.** Péptidos modulados significativamente ( $P < 0.05$ ) en la comparación de la condición RF+/ACPA+ frente al control (RF-/ACPA-). Péptidos: ALG, DLL (proteína 1), YVG, EQL, SDV (proteína 7), EIG, AVL (proteína 9), y VGY, VTS (proteína 10).

En la condición RF+/ACPA- (Figura 11), son 7 los péptidos estadísticamente modulados. Estos péptidos pertenecen a las proteínas 4, 5, 6, 7 y 9. Todos están aumentados, excepto los pertenecientes a la proteína 5.



**Figura 11.** Péptidos modulados significativamente ( $P < 0.05$ ) en la comparación de la condición RF+/ACPA- frente al control (RF-/ACPA-). Péptidos: WEL, VIP (proteína 4), LLN, YWG (proteína 5), YTF (proteína 6), SDV (proteína 7) y EIG (proteína 9).

Por último, en la figura 12 se indican los 9 péptidos estadísticamente aumentados obtenidos en la comparación de la condición RF-/ACPA+ y el control. Éstos pertenecen a las proteínas 4, 5, 6, 7, 8 y 9 y al igual que en el caso anterior (RF+/ACPA-), todos están aumentados a excepción de los péptidos de la proteína 5.



**Figura 12.** Péptidos modulados significativamente ( $P < 0.05$ ) en la comparación de la condición RF-/ACPA+ frente al control (RF-/ACPA-). Péptidos: WEL, EAQ (proteína 4), HLS, VLE (proteína 6), EHY, SDV (proteína 9), LLN (proteína 5), SDV (proteína 7) y EIG (proteína 9).

El análisis estadístico permitió observar, que, de los 26 péptidos analizados, se encontraron diferencias significativas en 19 de ellos (Tabla 3). El cálculo de las concentraciones de todos los péptidos endógenos modulados significativamente se encuentra recogido en las tablas del Anexo III.

**Tabla III.** Péptidos estadísticamente modulados ( $P < 0.05$ ) para cada condición comparada con el control (RF-/ACPA-).

Proteína	Péptido	RF+/ACPA+	RF+/ACPA-	RF-/ACPA+
1	ALG	X		
1	DLL	X		
4	WEL		X	X
4	EAQ			X
4	VIP		X	
5	LLN		X	X
5	YWG		X	
6	HLS			X
6	VLE			X
6	YTF		X	
7	YVG	X		
7	EQL	X		
7	SDV	X	X	X
8	EHV			X
8	SDV			X
9	EIG	X	X	X
9	AVL	X		
10	VGY	X		
10	VTS	X		

Todas las proteínas están sobreexpresadas a excepción de la proteína 5, que en la segunda (RF+/ACPA-) y tercera (RF-/ACPA+) comparación aparece disminuida frente al control (RF-/ACPA-). Esta proteína está implicada en la regulación del transporte de la vitamina A por el plasma sanguíneo y la transporta desde el depósito de la misma, localizado en el hígado, a los tejidos periféricos. Esta vitamina es esencial para el crecimiento, diferenciación celular y desarrollo del hueso (Tanumihardjo, 2013), por lo que su baja expresión podría influir en la falta de recuperación ósea en los pacientes que sufren degradación debido a la existencia de AR. Además, los péptidos SDV y EIG, pertenecientes a las proteínas 7 y 9

respectivamente, aparecen aumentados en todas las condiciones. Esto podría indicar que esas dos proteínas están estrechamente relacionadas entre sí.

Todas las proteínas que se encuentran moduladas participan de algún modo en la respuesta inmunitaria del organismo y se caracterizan por aumentar sus niveles en la APR (respuesta de fase aguda). Las funciones de estas proteínas, a parte de su papel de regulación del sistema inmunitario durante la APR, están relacionadas también con los procesos inflamatorios, regulación de la angiogénesis, proliferación celular y mantenimiento de tejidos blandos y óseos. Además, algunas son las encargadas de transportar otras proteínas por la corriente sanguínea o de almacenarlas, por lo que una alteración de sus niveles puede resultar muy perjudicial para el organismo.

En el trabajo de Sokolove et al. (2014), se evalúa la interacción y posible relación de RF y ACPA con la AR. Comparando el grupo RF+/ACPA+, con RF-/ACPA-, observaron una mayor actividad de la enfermedad, al igual que unos niveles de ESR y CRP más altos de lo normal, lo que puede relacionarse con procesos inflamatorios, en este caso derivados de la AR. Además, el hallazgo de altos niveles de varias citoquinas en comparación con control apoya la posible relación entre estos biomarcadores y la enfermedad.

El estudio de Aletaha et al. (2015) revela que el menor índice de actividad de la enfermedad (DAS) es el de los pacientes seropositivos únicamente para ACPA (RF-/ACPA+), mientras que los DAS más altos los alcanzan los pacientes RF+/ACPA+ o RF+/ACPA-. Estos datos sugieren que los DAS altos están relacionados con la positividad del factor reumatoide. Además, compararon los grupos evitando el doble positivo y, aparte de obtener nuevamente una mayor actividad en el grupo RF+, se vio una mayor actividad en el grupo ACPA- que en el ACPA+, lo que apoya que el RF+ esté asociado con mayor DAS y además la posibilidad de que el ACPA+ se asocie con menor actividad.

Un gran número de autores se han centrado en la investigación de proteínas que podrían ser posibles biomarcadores para la AR. Bramlage et al. (2006) estudiaron el comportamiento de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), y aunque se relacionan con la homeostasis, desarrollo de tejidos y regeneración ósea, aún no está muy claro su papel en cuanto al daño articular. Sus resultados revelan que, la proteína morfogenética 4 (BMP-4) y la proteína morfogenética 5 (BMP-5) están disminuidas en los pacientes con AR, por lo que sugieren que pueden estar realmente implicados en la homeostasis y en la regeneración de las articulaciones.

Otros posibles biomarcadores de enfermedad pueden ser las proteínas reconocidas por ACPA (Cantagrel, 2016). Algunas de las más estudiadas son el fibrinógeno, vimetina citrulinada, colágeno de tipo II citrulinado, fibronectina citrulinada y  $\alpha$ -enolasa citrulinada. Son proteínas que están presentes en las membranas sinoviales inflamadas y son componentes del cartílago de las articulaciones y de complejos inmunológicos.

Los resultados obtenidos en el estudio de Cylwik et al. (2010) muestran alteraciones en la concentración de un gran número de proteínas en comparación con controles sanos. Según estos resultados, en pacientes con AR, las proteínas moduladas son las siguientes: RF, haptoglobina,  $\alpha$ -1 glucoproteína ácida, proteína del complemento 3,  $\alpha$ -1 antitripsina y transferrina. El RF y la haptoglobina muestran un aumento en su concentración de 6 y 2 veces la concentración normal, y las demás aumentan entre un 60% y 20%, a excepción de la transferrina, que disminuye un 30%.

Actualmente, existe un gran número de investigadores, como los citados anteriormente, que se centran en el estudio de las proteínas asociadas con esta enfermedad, y la detección de anomalías en los niveles de éstas son un gran avance en la búsqueda de biomarcadores proteicos relacionados con AR.



## 5. Conclusiones

En este estudio se ha desarrollado un método de proteómica dirigida con el que se ha podido detectar un panel de 10 proteínas relacionadas con la artritis reumatoide (AR) tras el análisis de 80 muestras de suero de pacientes de diferentes condiciones en función a la ausencia/presencia de RF y ACPA.

Mediante la técnica MRM y el método del estándar interno se ha podido hacer una cuantificación relativa de las proteínas/péptidos de interés en las condiciones de estudio frente a la condición control.

Tras el análisis estadístico de los datos obtenidos se han detectado 8 proteínas moduladas de forma significativa que pueden ser potenciales biomarcadores de AR.

Para poder aplicar los resultados obtenidos a la clínica será necesaria la validación del panel de proteínas en cohortes más grandes de pacientes sanos y pacientes con otras enfermedades. Así, se podrá confirmar la especificidad de estas proteínas como biomarcadores para la AR. Esta validación está pendiente de realizarse mediante inmunoensayos (ELISA).

## 6. Referencias

Aletaha D, Alasti F, smolen JS. *Arthritis Res. Ther.* 2015; 17 (1): 229.

Aletaha D, Neogi T, Silman AJ et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2018; 62 (9): 2569-2581.

Apweiler R, Aslanidis C, Deufel T et al. Approaching Clinical Proteomics: Current State and Future Fields of Application in Cellular Proteomic. *Cytometry A.* 2009; 75A: 816-832.

Barker PE. Cancer Biomarker Validation: Standards and Process Roles for the National Institute of Standards and Technology (NIST). *Ann. NY. Acad. Sci.* 2003; 983 (1): 142-150.

Bermúdez-Crespo J, López J. A better understanding of molecular mechanisms underlying human disease. *Proteomics Clin. Appl.* 2007; 1 (9): 983–1003.

Bramlage CP, Häupl T, Kaps C et al. Decrease in expression of bone morphogenetic proteins 4 and 5 in synovial tissue of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2006; 8 (3): R58.

Cantagrel A, Degboé Y. New autoantibodies associated with rheumatoid arthritis recognize posttranslationally modified self-proteins. *Joint bone spine.* 2016; 83 (1): 11-17.

Castro-Santos P, Laborde CM, Díaz-Peña R. Genomics, proteomics and metabolomics: their emerging roles in the discovery and validation of rheumatoid arthritis biomarkers. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2015; 33 (2): 279-286.

Chang X, Cui Y, Zong, M et al. Identification of proteins with increased expression in rheumatoid arthritis synovial tissues. *J. Rheumatol.* 2009; 36 (5): 872-880.

Choy EHS, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344 (12): 907-916.

Colglazier CL, Sutej PG. Laboratory Testing in the Rheumatic Diseases: A Practical Review. *South Med. J.* 2005; 98 (2): 185-191.

Crowson CS, Matteson EL, Davis JM et al. Contribution of obesity to the rise in incidence of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res.* 2013; 65 (1): 71-77.

Cylwik B, Chrostek L, Gindzienska-sieskiewiez E et al. Relationship between serum acute-phase proteins and high disease activity in patients with rheumatoid arthritis. 2010; 55 (1): 80-85.

Deane K. Can rheumatoid arthritis be prevented?. Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. 2013; 27 (4): 467-485.

Deane KD, Demoruelle MK, Kelmenson LB et al. Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. Best Pract. Res. Clin. 2017; 31 (1): 3-18.

Fernández-Irigoyen J, Santamaría E, (Corrales FJ). Preparación de la muestra. Fraccionamiento de subproteomas e inmunodepleción de proteínas mayoritarias. En: Corrales F, Calvete JJ, editores. Manual de Proteómica, 2014; 363-380.

Fernández-Puente P, Calamia V, González-Rodríguez L et al. Multiplexed mass spectrometry monitoring of biomarker candidates for osteoarthritis. J Proteomics. 2017; 152: 216-225.

Gallien S, Duriez E, Domon B. Selected reaction monitoring applied to proteomics. J. Mass Spectrom. 2011; 46 (3): 298-312.

Gelpí, E. Historia de la espectrometría de masas. Principios básicos. Partes y tipos de espectrómetros de masas. En: Corrales F, Calvete JJ, editores. Manual de proteómica. 2014; 111-126.

Gómez A. Anticuerpos antipéptidos citrulinados en la artritis reumatoide. Rev. Esp. Reumatol. 2004; 31 (4): 165-168.

Hinterwirth H, Stegemann C, Mayr M. Lipidomics: Quest for Molecular Lipid Biomarkers in Cardiovascular Disease. Circ. Cardiovasc. Genet. 2014; 7 (6): 941-954.

Hortin GL, Jortani SA, Ritchie JC et al. Proteomics: A New Diagnostic Frontier. Clin. Chem. 2006; 52 (7): 1218-1222.

Kapetanovic MC, Lindqvist E, Saxne T et al. Orthopaedic surgery in patients with rheumatoid arthritis over 20 years: prevalence and predictive factors of large joint replacement. Ann. Rheum. Dis. 2008; 67 (10): 1412-1416.

Kidd BA, Ho PP, Sharpe O et al. Epitope spreading to citrullinated antigens in mouse models of autoimmune arthritis and demyelination. Arthritis Res. Ther. 2008; 10 (5): R119.

Kroot E, De Jon B, Van Leeuwen MA et al. The prognostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with recent-onset rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2000; 43 (8): 1831-1835.

Lange V, Picotti P, Domon B et al. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. Mol. Syst. Biol. 2008; 4 (1): 222.

Le Blanc A, Michaud SA, Percy AJ et al. Multiplexed MRM-Based Protein Quantitation Using Two Different Stable Isotope-Labeled Peptide Isotopologues for Calibration. *J. Proteome Res.* 2017; 16 (7): 2527-2536.

Lindstrom TM, Robinson WH. Biomarkers for rheumatoid arthritis: Making it personal. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 2010; 70 (sup 242): 79-84.

Lorenz P, Ruschpler P, Koczan D et al. From transcriptome to proteome: Differentially expressed proteins identified in synovial tissue of patients suffering from rheumatoid arthritis and osteoarthritis by an initial screen with a panel of 791 antibodies. *Proteomics.* 2003; 3 (6): 991-1002.

Lourido, L. Búsqueda de biomarcadores de artrosis mediante técnicas proteómica. [Tesis doctoral]. A Coruña: 2015.

Lourido L, Blanco FJ, Ruiz-Romero C. Defining the proteomic landscape of rheumatoid arthritis: progress and prospective clinical applications. *Expert Rev. Proteomics.* 2017; 14 (5): 431-444.

Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat. Rev. Cancer.* 2005; 5 (11): 845-856.

MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheumatol.* 2000; 43 (1): 30-37.

MacLean B, Tomazela DM, Shulman N et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics.* 2010; 26 (7): 966-968.

Mateos J, Lourido L, Fernández-Puente P et al. Differential protein profiling of synovial fluid from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients using LC-MALDITOF/TOF. *J. proteomics.* 2012; 75 (10): 2869-2878.

Pando-Robles RV, Lanz-Mendoza H. La importancia de la proteómica en la salud pública. *Salud Pública Mex.* 2009; 51 (3): 386-394.

Poley A, Ortega JA, Pedregal M et al. Prevalencia de enfermedades osteoarticulares y consumo de recursos. Calidad de vida y dependencia en pacientes con artrosis. *Semergen.* 2011; 37 (9): 462-467.

Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat. Biotechnol.* 2006; 24 (8): 971-983.

Ruiz-Romero C, Blanco FJ. Proteomics role in the search for improved diagnosis, prognosis and treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010; 18 (4): 500-509.

Ruiz-Romero C, Blanco FJ. Achievements and challenges of proteomics in the study of rheumatoid arthritis. *Curr. Top. Med. Chem.* 2013; 13 (6): 732-742.

Sokolove J, Johnson DS, Lahey LJ. Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody mediated inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2014; 66 (4): 813-821.

Smolik I, Robinson DB, Bernstein CN et al. First-degree relatives of patients with rheumatoid arthritis exhibit high prevalence of joint symptoms. *J. Rheumatol.* 2013; 40 (6): 818-824.

Tanumihardjo SA. Vitamin A and Bone Health: The Balancing Act. *J. Clin. Dens.* 2013; 16 (4): 414-419.

Tilleman K, Deforce D. Proteomics in rheumatology. *Expert. Rev. Proteomics.* 2008; 5 (6): 755-759.

Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 2009; 9 (5): A288-A292.

Turesson C, O'Fallon WM, Crowson CS et al. Extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis: incidence trends and risk factors over 46 years. *Ann. Rheum. Dis.* 2003; 62 (8): 722-727.

Wither MJ, Hansen KC, Reisz JA. Mass Spectrometry-Based Bottom-Up Proteomics: Sample Preparation, LC-MS/MS Analysis, and Database Query Strategies. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2016; 86 (1): 16.4.1-16.4.20.

Ziemer M, Müller A, Hein G et al. Incidence and classification of cutaneous manifestations in rheumatoid arthritis. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.* 2016; 14 (12): 1237-1246.

**ANEXO I.** Datos descriptivos de las muestras utilizadas en este estudio. Se indica la condición (RF/ACPA), sexo y edad de cada uno de los pacientes.

RF+/ACPA+		
ID MUESTRA	SEXO	EDAD
130	F	75
131	F	55
132	F	46
135	F	70
137	F	46
138	M	45
139	F	41
144	F	72
148	F	79
149	F	70
156	M	72
158	F	61
159	F	65
160	F	60
162	F	79
165	F	68
167	M	60
169	F	53
170	M	68
176	M	67

RF-/ACPA-		
ID MUESTRA	SEXO	EDAD
128	M	74
140	M	56
150	F	67
153	M	65
161	F	51
163	F	54
171	F	65
177	F	54
190	F	59
191	F	68
198	F	62
203	M	82
207	F	27
210	F	36
212	F	73
214	F	64
221	F	74
224	M	28
227	F	66
231	F	49

RF+/ACPA-		
ID MUESTRA	SEXO	EDAD
133	M	66
136	F	42
141	M	82
168	M	66
175	F	59
199	F	72
206	F	78
243	F	57
276	F	87
286	F	75
289	F	67
290	F	82
293	F	50
303	F	69
314	M	68
322	F	51
329	F	64
332	F	26
337	F	51
347	F	40

RF-/ACPA+		
ID MUESTRA	SEXO	EDAD
125	F	53
134	F	79
143	F	46
152	F	81
172	F	63
174	F	68
230	M	58
240	F	42
256	F	65
258	M	52
261	F	39
269	F	74
280	F	62
288	F	40
304	F	59
313	F	56
336	F	63
341	F	75
356	F	56
357	F	53

**ANEXO II.** Proteínas analizadas mediante proteómica dirigida. En la tabla se indican los péptidos, la relación m/z del precursor y del producto (fragmento), el tipo de ion, el isótopo (light o péptido endógeno); heavy o péptido estándar), potencial de disgregación (DP) y energía de colisión (CE).

Proteína	Secuencia peptídica	Precursor m/z	Producto m/z	Tipo Ion	Isótopo	DP	CE (V)
1	ALG	576,81	774,41	+2y7	light	73,2	29,6
			661,33	+2y6			
			546,30	+2y5			
		581,81	784,42	+2y7	heavy		
			671,33	+2y6			
			556,31	+2y5			
	TLD	1019,05	1166,68	+2y10	light	105,4	45,5
			1053,59	+2y9			
			823,50	+2y7			
		1024,05	1176,69	+2y10	heavy		
			1063,60	+2y9			
			833,51	+2y7			
	DLL	590,34	838,48	+2y7	light	74,2	30,1
			725,39	+2y6			
			342,20	+2b3			
595,34		848,49	+2y7	heavy			
		735,40	+2y6				
		342,20	+2b3				
2	ATF	612,00	813,48	+3y7	light	75,7	30,9
			714,41	+3y6			
			617,36	+3y5			
		615,33	823,49	+3y7	heavy		
			724,42	+3y6			
			627,37	+3y5			
	IPS	523,31	835,47	+2y7	light	69,3	27,7
			748,44	+2y6			
			649,37	+2y5			
		527,31	843,48	+2y7	heavy		
			756,45	+2y6			
			657,38	+2y5			
	TSS	808,95	1010,59	+2y9	light	90,1	38
			896,55	+2y8			
			783,46	+2y7			
812,96		1018,60	+2y9	heavy			
		904,56	+2y8				
		791,48	+2y7				

3	GVT	913,99	1055,56	+2y9	light	97,7	41,8
			472,32	+2y4			
			1143,58	+2b11			
		919,00	1065,57	+2y9	heavy		
			482,33	+2y4			
			1143,58	+2b11			
	LED	797,40	777,45	+2y7	light	89,2	37,6
			664,37	+2y6			
			577,33	+2y5			
		801,40	785,46	+2y7	heavy		
672,38			+2y6				
585,35			+2y5				
4	WEL	544,76	773,40	+2y6	light	70,8	28,5
			660,31	+2y5			
			500,28	+2y4			
		549,77	783,41	+2y6	heavy		
			670,32	+2y5			
			510,29	+2y4			
	VIP	885,96	1020,51	+2y9	light	95,7	40,8
			933,48	+2y8			
		890,97	1030,52	+2y9	heavy		
			943,49	+2y8			
	EAQ	570,82	812,49	+2y7	light	72,7	29,4
			699,40	+2y6			
			329,15	+2b3			
		574,82	820,50	+2y7	heavy		
707,42			+2y6				
329,15			+2b3				
5	YWG	599,82	849,48	+2y8	light	74,8	30,5
			693,39	+2y6			
			622,36	+2y5			
		603,82	857,50	+2y8	heavy		
			701,41	+2y6			
			630,37	+2y5			
	LLN	1032,99	1178,55	+2y10	light	106,4	46
			1107,51	+2y9			
			742,39	+2y6			
		1037,99	1188,56	+2y10	heavy		
1117,52			+2y9				
752,40			+2y6				



6	YTF	458,23	752,39	+2y6	light	64,5	25,4
			651,35	+2y5			
			504,28	+2y4			
		463,24	762,40	+2y6	heavy		
			661,35	+2y5			
			514,29	+2y4			
	HLS	418,91	590,33	+3y5	light	61,7	20,4
			489,28	+3y4			
			376,19	+3y3			
		422,25	600,33	+3y5	heavy		
			499,29	+3y4			
			386,20	+3y3			
VLE	400,25	700,42	+2y6	light	60,3	23,3	
		458,30	+2y4				
	404,26	708,44	+2y6	heavy			
		466,31	+2y4				
7	YVG	584,99	982,62	+3y8	light	73,8	29,4
			835,55	+3y7			
			764,51	+3y6			
		588,33	992,63	+3y8	heavy		
			845,56	+3y7			
			774,52	+3y6			
	EQL	871,91	1186,56	+2y9	light	94,7	40,2
			1039,49	+2y8			
			876,42	+2y7			
		876,91	1196,56	+2y9	heavy		
			1049,50	+2y8			
			886,43	+2y7			
	SDV	556,77	910,47	+2y7	light	71,7	28,9
			811,40	+2y6			
			401,20	+2b4			
		560,77	918,48	+2y7	heavy		
			819,41	+2y6			
			401,20	+2b4			

8	EHV	412,24	798,50	+3y6	light	61,2	20
			661,44	+3y5			
			548,36	+3y4			
		415,58	808,51	+3y6	heavy		
			671,45	+3y5			
			558,36	+3y4			
	EQL	705,00	1046,51	+3y8	light	82,5	35,9
			933,43	+3y7			
			818,40	+3y6			
		708,33	1056,52	+3y8	heavy		
			943,44	+3y7			
			828,41	+3y6			
SDV	572,75	942,44	+2y7	light	72,9	29,5	
		843,37	+2y6				
		712,33	+2y5				
	576,76	950,45	+2y7	heavy			
		851,38	+2y6				
		720,34	+2y5				
9	EIG	531,30	819,46	+2y7	light	69,8	28
			633,40	+2y5			
			520,31	+2y4			
		535,30	827,48	+2y7	heavy		
			641,41	+2y5			
			528,33	+2y4			
	AVL	954,48	1134,56	+2y12	light	100,7	43,2
			1005,52	+2y11			
			718,41	+2y8			
		958,49	1142,58	+2y12	heavy		
			1013,54	+2y11			
			726,42	+2y8			
10	VGY	490,75	824,40	+2y7	light	66,9	26,5
			661,34	+2y6			
			562,27	+2y5			
		495,76	834,41	+2y7	heavy		
			671,35	+2y6			
			572,28	+2y5			
	VTS	602,32	916,49	+2y7	light	75	30,5
			803,40	+2y6			
			675,35	+2y5			
		606,33	924,50	+2y7	heavy		
			811,42	+2y6			
			683,36	+2y5			

**ANEXO III.** Tablas resumen con las concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ ) de los péptidos endógenos calculados con el método del estándar interno. Tabla A: RF+/ACPA+; Tabla B: RF-/ACPA-; Tabla C: RF+/ACPA-; Tabla D: RF-/ACPA+.

**Tabla A**

Prot.	Péptido	Péptido heavy fmol	V iny.	RF+/ACPA+																				
				ID	1,9	1,6	1,3	2,5	1,6	3,0	2,1	1,6	1,6	1,7	1,9	1,9	2,1	2,1	5,7	1,6	1,9	1,5	1,4	1,4
				MW	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
1	ALG	50	34346,41	48,03	40,97	21,70	28,66	31,72	13,77	37,20	20,76	38,74	13,53	14,81	15,35	12,40	19,54	6,57	23,58	25,71	20,28	24,55	33,53	
	TLD	100		119,71	122,62	51,04	72,31	108,63	32,06	40,13	51,24	81,96	32,26	42,64	28,76	19,46	28,89	13,00	38,14	47,84	42,43	43,23	62,63	
	DLL	25		48,16	43,82	21,46	27,45	32,06	13,46	17,98	21,84	41,54	16,90	19,03	12,84	9,38	17,36	7,30	24,10	24,26	20,66	24,44	31,43	
2	ATF	100	512858,3	1406,16	2635,22	2311,26	1768,15	701,52	173,40	1326,84	1585,74	2638,15	815,50	877,42	811,60	729,21	770,29	464,21	1450,63	1352,63	950,40	2679,54	1690,20	
	IPS	50		2200,36	4052,68	3822,47	2248,53	1003,53	603,01	2421,02	2654,89	4547,44	982,67	1410,66	1454,10	1665,56	1882,59	581,05	2703,33	2817,27	2088,30	5529,49	3807,78	
	TSS	100		663,19	1346,21	1285,71	1256,74	1163,80	469,35	811,62	1081,76	1614,10	883,98	714,86	663,07	535,58	674,26	315,64	807,55	827,88	544,89	1495,49	1083,55	
3	GVT	250	52843,36	533,12	658,48	619,73	497,11	497,99	284,04	447,40	567,22	787,22	427,14	331,93	277,30	215,13	292,22	186,82	382,08	500,49	412,87	562,71	864,69	
	LED	100		124,63	154,97	140,04	103,44	106,31	60,90	120,71	142,14	209,17	124,58	100,36	75,26	58,67	100,58	49,86	113,98	159,66	133,52	167,99	292,43	
4	WEL	250	88432,36	679,00	1394,52	823,89	932,02	1360,84	492,68	1114,87	1159,55	1592,14	946,47	738,21	718,40	792,16	821,94	338,40	984,96	998,89	973,46	1358,87	1551,99	
	VIP	250		121,04	283,75	280,72	205,43	279,04	125,11	190,48	204,07	299,39	185,25	162,64	155,08	175,02	158,91	70,38	193,95	191,08	187,97	259,85	248,26	
	EAQ	100		124,73	214,66	257,91	174,72	218,62	86,56	180,96	173,75	241,72	153,56	114,68	122,98	133,59	118,81	51,50	148,06	145,27	150,49	195,07	209,09	
5	YWG	100	21071,6	15,76	80,65	74,56	40,99	54,46	13,90	35,88	48,94	59,84	45,95	38,32	26,78	40,38	37,62	26,70	53,51	63,29	47,00	56,44	77,08	
	LLN	250		185,84	1125,45	995,27	686,78	1020,90	145,53	536,68	533,25	734,96	227,25	231,71	311,46	259,40	309,55	181,56	369,45	522,35	381,15	458,28	600,92	
6	YTF	100	51243,46	193,49	336,48	319,92	258,54	338,15	112,61	218,16	219,20	290,61	161,89	137,14	138,55	176,92	149,46	59,85	207,95	227,79	219,04	295,69	284,25	
	HLS	250		418,15	787,80	790,63	640,03	937,49	296,09	579,40	504,27	661,95	541,58	417,85	364,35	414,80	355,03	150,40	504,96	484,14	489,73	635,82	550,17	
	VLE	100		122,13	343,60	287,08	189,19	290,46	93,88	189,93	195,03	264,32	181,94	144,47	126,73	148,50	128,84	54,77	170,30	188,43	191,68	264,69	239,71	
7	YVG	250	21560,12	500,23	621,14	421,79	529,54	905,30	365,94	413,23	441,01	442,52	163,28	260,79	268,32	232,22	408,41	129,81	448,19	459,00	432,43	366,53	541,59	
	EQL	250		601,35	676,12	515,94	663,06	1149,17	380,62	470,50	484,13	545,24	156,01	274,56	265,60	246,81	356,29	109,02	409,36	475,41	413,84	411,68	656,86	
	SDV	250		1249,54	1409,53	1066,00	1181,90	1514,80	666,63	810,14	1000,08	901,64	340,72	537,63	494,77	630,87	873,83	206,58	1007,62	470,30	951,98	843,48	1668,69	
8	EHV	250	21651,19	113,91	303,76	318,86	155,16	273,18	152,04	202,71	238,03	232,53	116,37	130,64	89,45	91,23	182,97	43,25	217,15	174,86	139,88	126,69	271,99	
	EQL	250		1833,56	4923,97	4223,02	3863,25	8066,32	2416,49	4992,71	6269,12	5556,57	1553,20	2259,94	1499,94	1012,48	2250,14	456,95	2113,30	2854,59	2217,27	1807,24	4135,91	
	SDV	250		232,01	575,68	616,72	259,30	368,46	239,06	323,87	425,66	424,38	186,28	202,40	146,44	184,49	360,17	68,18	403,72	974,13	264,08	247,86	673,44	
9	EIG	250	45265,82	209,94	275,19	173,21	184,93	464,11	119,35	213,86	202,02	209,14	79,32	118,13	97,78	95,12	163,79	62,73	163,14	168,44	202,61	160,32	323,18	
	AVL	250		4286,42	7050,86	3852,82	4282,45	12553,83	2535,53	4895,19	4551,08	5859,26	1868,53	2435,76	2375,72	2385,49	3824,46	1313,20	3460,46	3441,94	4065,20	3103,22	6445,00	
10	VGY	250	43349,01	1808,15	2165,89	1596,93	1863,85	2026,57	1143,47	942,02	1322,34	1548,42	826,68	1218,20	967,96	1120,78	1348,94	432,00	1731,52	1776,65	1057,80	1945,87	2626,64	
	VTS	250		2046,42	2498,36	1659,75	1980,64	2388,41	1399,70	973,80	1383,12	1600,97	884,81	1366,07	953,39	1232,15	1560,86	451,54	1923,90	1987,26	1055,27	2052,99	2861,50	

**Tabla B**

			RF-/ACPA-																				
			V iny.	1,5	1,7	1,4	2,3	1,9	1,2	1,5	1,4	1,8	2,1	2,0	1,6	1,4	1,7	1,9	1,9	1,6	1,5	1,8	1,8
Prot.	Péptido	Péptido heavy fmoi	ID	128	140	150	153	161	163	171	177	190	191	198	203	207	210	212	214	221	224	227	231
			MW	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
1	ALG	50	34346,41	26,00	25,29	25,83	12,22	15,67	39,98	38,59	25,23	9,16	11,18	20,64	33,87	27,83	16,78	12,07	14,09	13,14	21,27	18,90	14,74
	TLD	100		135,62	42,61	44,41	33,54	88,84	94,36	73,20	64,87	27,50	28,80	51,16	65,55	48,54	27,47	18,84	28,95	24,20	38,33	37,12	23,93
	DLL	25		18,19	17,28	21,84	9,93	13,91	39,40	32,04	21,87	12,13	16,12	28,37	31,05	25,91	13,98	9,88	14,71	12,36	20,21	18,73	11,44
2	ATF	100	512858,3	4753,75	997,70	2034,82	399,51	2300,12	1092,41	1406,84	2226,13	1184,59	676,43	560,67	999,14	1125,60	934,48	1066,14	1672,23	763,29	1174,77	935,72	1620,87
	IPS	50		5288,45	1564,29	3129,24	604,74	1791,10	1675,69	2231,54	3966,32	1223,06	854,81	769,74	1826,83	2896,79	1510,66	1885,07	3439,38	1548,15	2475,87	1806,90	2664,63
	TSS	100		4336,99	587,15	1240,81	796,80	2096,09	868,29	837,41	1435,28	1028,73	694,50	642,66	751,58	954,86	710,12	774,67	1036,34	463,06	821,01	552,85	804,48
3	GVT	250	52843,36	1286,43	344,93	613,50	249,26	795,58	810,25	330,25	582,07	16,80	425,67	350,63	545,19	584,86	317,91	384,08	379,84	101,96	470,34	317,47	133,16
	LED	100		263,74	100,30	143,64	40,04	139,55	183,07	75,25	137,75	1,74	104,77	95,98	140,57	157,27	91,77	113,19	124,28	32,39	132,39	124,58	29,42
4	WEL	250	88432,36	1803,44	576,08	1485,68	529,16	1030,27	1425,23	1423,47	1175,55	677,70	657,61	710,32	867,16	1184,87	895,86	939,23	1001,38	618,54	1209,79	1025,79	1021,32
	VIP	250		448,12	110,68	288,42	134,43	176,37	296,08	315,70	228,01	149,05	142,22	174,52	157,13	232,63	159,78	158,15	194,85	116,38	247,45	178,39	175,71
	EAQ	100		311,68	128,27	300,51	111,08	174,39	261,15	237,39	213,57	118,60	117,06	127,33	142,53	197,41	133,99	137,86	172,83	95,83	195,26	166,18	157,06
5	YWG	100	21071,6	172,88	29,18	101,58	23,68	47,03	50,38	80,70	42,93	35,78	27,56	19,15	42,27	42,43	43,30	48,14	42,98	33,37	46,65	36,35	41,58
	LLN	250		2703,70	367,33	1212,19	356,75	936,82	872,26	944,97	710,98	371,26	252,96	168,91	366,84	223,09	352,91	352,87	369,30	299,86	446,78	273,01	301,92
6	YTF	100	51243,46	324,93	156,05	348,72	130,32	283,60	300,22	359,83	248,42	118,96	128,88	91,24	216,84	257,95	211,26	150,88	162,66	119,96	265,07	187,75	214,07
	HLS	250		926,35	366,33	792,98	352,10	781,09	696,83	898,40	597,84	367,27	463,53	378,11	477,72	560,30	472,33	352,15	339,34	252,48	542,30	342,58	439,16
	VLE	100		252,06	161,46	271,88	125,24	232,70	289,12	308,75	222,50	142,99	150,06	124,21	190,61	222,75	172,22	126,97	145,39	102,05	234,16	154,45	184,18
7	YVG	250	21560,12	677,81	278,48	418,89	234,37	370,71	806,28	350,14	357,66	162,67	198,98	288,66	522,63	340,88	170,28	228,62	274,22	128,21	291,79	130,51	293,89
	EQL	250		1054,00	360,05	511,08	293,14	797,03	1000,63	381,12	456,29	188,49	202,42	244,99	540,20	277,66	185,53	215,81	312,14	141,30	295,48	152,85	368,45
	SDV	250		907,76	707,26	1044,93	174,92	656,26	1544,42	769,97	437,53	305,68	355,51	478,35	1187,85	692,82	428,52	552,38	662,21	373,07	648,48	418,11	933,55
8	EHV	250	21651,19	291,75	144,70	252,74	120,54	179,23	291,49	248,37	165,32	137,55	114,66	92,68	238,17	190,45	141,69	146,93	161,64	89,15	191,41	100,92	114,21
	EQL	250		58,17	1602,81	3747,76	2933,26	7633,32	9801,96	6475,61	4893,32	2179,83	1551,56	1159,05	2868,37	1752,73	1495,29	1677,68	2391,47	1380,41	2838,93	1277,44	1367,02
	SDV	250		454,62	256,58	506,98	382,55	286,22	489,12	427,61	676,82	184,25	166,80	120,91	441,79	390,33	280,47	302,15	336,00	182,24	371,96	236,72	263,92
9	EIG	250	45265,82	159,36	142,35	231,66	108,58	167,73	309,14	178,87	153,45	77,37	120,64	157,02	213,59	156,51	111,27	85,85	112,01	36,92	147,43	104,14	77,43
	AVL	250		6710,67	3007,53	5406,17	3256,01	6383,71	7023,57	4494,34	3511,27	1612,05	2890,73	3611,48	5209,04	3622,73	2336,33	1620,72	2344,04	847,73	2950,75	2072,05	1627,75
10	VGY	250	43349,01	1119,41	1352,46	2542,99	1078,44	1324,10	2571,34	986,43	1105,62	320,42	859,32	1283,52	2128,42	1087,28	900,85	1080,89	1120,79	693,58	1363,43	440,26	1111,88
	VTS	250		1196,72	1399,71	2755,22	1229,75	1525,87	2865,12	1001,00	1119,40	299,81	932,54	1511,14	2478,48	1084,54	942,92	1177,97	1178,82	666,52	1354,97	429,95	1171,04

Tabla C

Prot.	Péptido	Péptido heavy fmol	V iny. ID	RF+/ACPA-																			
				1,4	1,5	1,6	1,7	2,1	2,1	2,2	1,5	2,0	2,0	2,0	2,2	1,7	1,4	2,8	1,6	1,7	2,1	1,6	2,0
				133	136	141	168	175	199	206	243	276	286	289	290	293	303	314	322	329	332	337	347
MW	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	
1	ALG	50	34346,41	39,16	20,16	24,39	19,69	14,85	12,99	28,58	30,87	47,72	27,28	165,62	1474,14	3,00	12,31	5,22	8,73	1,53	8,38	9,07	66,05
	TLD	100		33,82	36,01	45,23	31,13	23,36	20,87	52,68	49,38	47,19	51,56	23,49	24,53	33,63	24,33	21,78	51,23	81,21	59,88	65,72	85,89
	DLL	25		19,99	17,33	22,80	19,64	11,81	10,96	25,29	29,64	23,84	24,66	16,24	12,85	19,39	12,83	12,71	30,10	43,80	28,52	34,37	44,86
2	ATF	100	512858,3	1802,60	1636,09	1574,45	1283,47	860,95	760,76	1107,64	1962,81	768,36	617,22	765,28	471,91	1114,71	882,83	1134,02	966,64	1365,88	1242,67	1764,39	891,25
	IPS	50		3354,34	3428,42	3706,87	2982,06	1865,69	1366,18	1874,03	4133,87	1316,82	962,47	1489,71	911,97	2145,11	1736,85	2109,95	2027,33	2809,29	2590,77	3268,37	1607,02
	TSS	100		1135,17	984,84	1055,41	1356,74	957,30	828,62	675,67	2034,32	708,22	760,49	772,37	508,60	1182,22	817,36	934,51	819,04	962,27	835,12	1245,76	614,92
3	GVT	250	52843,36	629,72	387,27	372,43	153,56	325,46	382,82	469,24	574,61	502,49	576,26	201,19	246,98	442,00	459,54	397,83	449,37	511,68	150,56	593,96	444,48
	LED	100		238,65	164,30	144,71	5,14	88,76	90,46	120,81	154,44	124,41	159,23	38,44	63,96	90,93	116,90	106,64	109,44	214,12	26,70	223,12	185,07
4	WEL	250	88432,36	1580,50	1069,49	1147,94	2001,46	1172,27	1050,55	1514,99	2233,12	957,48	1357,02	1038,94	921,84	1561,94	1498,23	1093,16	2144,96	1944,98	2067,84	1812,39	1202,80
	VIP	250		281,70	145,45	206,07	308,09	199,20	164,97	239,80	330,81	196,51	243,22	172,59	159,06	262,72	214,31	148,80	295,83	223,75	252,80	242,43	149,87
	EAQ	100		253,37	143,18	177,04	232,11	163,97	143,97	139,00	240,23	129,16	163,71	115,33	118,14	220,81	216,28	110,27	244,05	185,83	223,70	203,27	138,68
5	YWG	100	21071,6	85,61	38,61	55,15	97,49	57,30	33,81	34,70	78,45	46,99	55,66	31,38	35,25	46,16	55,93	39,12	71,12	53,20	47,01	63,49	36,36
	LLN	250		659,06	298,85	395,12	433,97	276,10	200,91	159,16	361,52	254,97	233,62	193,24	221,91	215,47	261,36	167,28	303,28	289,83	273,51	318,18	165,66
6	YTF	100	51243,46	322,78	255,02	231,67	264,68	180,79	157,88	158,29	305,59	140,55	166,92	155,66	122,80	229,50	256,26	161,84	301,04	298,91	365,67	295,05	225,26
	HLS	250		674,12	497,38	437,00	690,11	450,15	399,52	432,31	821,58	385,12	425,22	408,84	336,40	572,92	633,26	370,50	704,38	670,43	818,94	623,38	454,45
	VLE	100		249,70	223,63	215,95	221,83	169,84	136,00	134,79	261,40	137,50	162,13	119,15	113,72	210,64	233,05	129,15	231,09	234,42	299,51	250,73	175,91
7	YVG	250	21560,12	348,28	296,17	342,74	440,77	202,51	188,02	475,64	370,12	517,73	529,13	197,61	158,64	373,07	237,38	232,46	579,42	377,09	178,23	530,74	546,35
	EQL	250		375,36	404,85	370,08	289,72	186,22	169,89	416,76	303,18	382,88	436,52	163,12	127,28	315,76	194,45	224,81	445,39	427,13	193,77	631,96	620,54
	SDV	250		1187,29	1034,36	1026,17	970,62	499,16	438,66	1062,93	1194,58	1090,33	1316,53	435,28	370,84	780,97	462,26	657,77	1397,24	1273,71	773,51	1536,13	1720,21
8	EHV	250	21651,19	147,34	211,36	115,45	235,53	133,01	84,03	194,81	237,20	192,29	174,98	119,81	94,35	176,33	181,06	137,54	211,41	207,59	114,31	256,79	238,05
	EQL	250		1875,00	2689,81	1477,36	2269,68	1277,36	719,41	2461,98	2930,60	2067,12	1716,35	1602,82	1280,19	2036,62	2035,05	1608,37	2001,36	3430,01	1801,02	3700,48	3016,06
	SDV	250		336,61	467,50	266,41	473,50	247,79	154,53	414,50	502,64	382,51	392,30	204,60	132,69	278,82	305,86	252,77	398,69	520,37	261,53	643,05	571,22
9	EIG	250	45265,82	144,19	211,65	144,17	92,77	120,30	105,29	273,03	163,10	181,65	298,01	130,49	77,91	123,29	142,22	95,74	166,84	172,61	147,76	254,53	327,62
	AVL	250		2660,29	4343,07	2922,61	5071,32	2866,91	2653,44	5777,31	3642,32	4358,19	6543,90	2950,95	1797,93	2663,03	3117,12	2058,11	4114,43	3069,26	2849,17	4899,68	7373,93
10	VGY	250	43349,01	1731,75	1196,68	984,03	1142,47	555,47	1196,01	1279,48	1189,45	1716,74	2832,22	463,71	449,73	713,62	1486,71	1144,35	2126,08	2520,13	1195,27	2092,27	1374,20
	VTS	250		1880,43	1212,12	975,57	1166,17	563,71	1239,39	1342,01	1223,06	1587,10	2644,57	500,07	471,04	708,39	1529,56	1295,27	2172,31	2571,75	1167,52	2038,83	1366,58

**Tabla D**

Prot.	Péptido	Péptido heavy fmol	V iny. ID	RF-/ACPA+																			
				1,8	2,8	1,6	2,4	1,8	2,2	1,5	2,3	1,6	1,5	1,7	1,8	1,5	2,1	2,1	1,5	1,7	1,8	2,0	2,2
				125	134	143	152	172	174	230	240	256	258	261	269	280	288	304	313	336	341	356	357
MW	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml		
1	ALG	50	34346,41	17,95	10,60	27,08	12,66	31,71	11,92	27,95	75,04	83,16	24,25	10,89	279,49	0,00	1,20	1,27	1,72	1,40	9,99	3,99	6,91
	TLD	100		29,45	16,72	42,91	20,44	56,49	21,80	55,16	36,60	21,35	69,92	26,94	34,87	44,92	27,26	35,00	52,20	33,88	52,19	39,74	121,30
	DLL	25		14,58	8,68	22,31	8,20	29,40	11,92	30,45	17,13	13,54	42,65	14,63	17,93	19,34	11,96	19,76	23,29	16,40	26,65	19,13	61,41
2	ATF	100	512858,3	1810,05	623,10	2056,58	1178,23	1390,04	864,96	1958,25	608,34	940,56	1241,89	516,25	1097,18	1673,58	498,84	1000,80	2532,20	1195,25	1368,91	1366,79	3300,61
	IPS	50		1991,38	1014,26	3006,53	1876,40	2028,11	1237,36	3129,97	1210,18	1761,20	2472,50	878,01	2234,87	2810,85	848,09	1974,66	4428,19	2368,55	2538,67	2355,27	5222,98
	TSS	100		954,70	552,13	1279,93	673,82	678,77	571,69	1107,69	400,85	612,81	885,92	787,61	770,85	1399,94	806,86	992,55	1618,11	997,57	1012,56	885,28	1613,21
3	GVT	250	52843,36	355,90	234,20	430,18	300,78	604,39	30,18	70,52	137,09	531,58	531,29	442,42	403,52	662,77	324,61	511,41	528,56	527,14	459,55	162,15	911,22
	LED	100		89,19	66,82	128,35	73,44	155,89	2,33	13,81	22,61	127,56	138,89	90,95	127,63	123,56	71,45	134,58	165,49	167,69	164,02	47,08	444,62
4	WEL	250	88432,36	1524,01	755,64	1739,18	935,03	1269,44	1056,16	1900,68	810,13	1172,42	1853,93	1235,39	1322,48	1931,70	458,80	1463,04	2220,84	2078,17	1515,66	1565,52	2899,44
	VIP	250		195,63	100,18	257,06	123,51	172,61	137,45	266,85	121,99	172,31	295,46	178,97	210,14	376,27	77,50	206,45	299,07	229,97	167,00	167,24	277,50
	EAQ	100		175,76	91,72	218,88	105,09	138,43	120,24	191,80	111,06	169,21	243,23	171,65	164,53	252,69	181,33	175,79	287,96	225,26	184,58	172,02	324,55
5	YWG	100	21071,6	51,53	30,78	63,35	50,15	62,96	32,99	96,09	34,77	36,69	74,17	43,03	38,33	64,81	5,74	59,51	77,61	49,34	22,27	42,74	38,21
	LLN	250		256,79	179,60	401,37	366,57	415,63	181,19	660,70	200,66	251,62	389,02	255,18	192,14	383,88	11,45	299,84	424,34	296,24	84,41	282,64	253,37
6	YTF	100	51243,46	241,56	120,44	280,57	164,82	178,33	117,71	222,49	236,28	195,91	264,63	128,80	204,08	257,74	185,31	207,61	292,09	261,76	257,24	216,20	449,85
	HLS	250		601,56	291,73	634,64	399,89	542,47	332,11	661,49	711,33	490,90	708,85	507,85	544,54	748,94	495,91	538,91	726,73	608,25	612,34	439,02	880,42
	VLE	100		217,41	105,98	254,37	139,69	185,00	117,07	245,82	255,71	171,47	243,20	203,38	192,24	209,64	184,30	179,57	298,03	222,08	217,80	182,00	387,51
7	YVG	250	21560,12	278,84	130,53	293,57	243,90	613,11	216,50	665,77	194,92	396,44	743,23	288,73	344,09	482,57	159,14	356,39	385,07	255,33	295,12	235,08	535,22
	EQL	250		292,93	121,89	283,45	223,53	578,33	179,43	485,77	166,15	345,66	646,50	161,95	320,21	346,03	44,57	318,45	444,66	273,20	320,49	262,23	813,61
	SDV	250		717,63	313,81	827,17	614,01	1336,10	915,75	4647,02	342,09	953,83	1623,57	450,21	823,27	980,31	611,01	457,54	1320,31	851,81	1010,41	789,08	2241,89
8	EHV	250	21651,19	174,41	81,54	221,61	137,83	297,92	117,20	164,02	136,19	128,11	380,20	183,33	116,68	308,34	117,06	147,62	299,23	206,78	176,27	168,31	294,15
	EQL	250		1726,94	729,29	2293,49	1437,14	3233,25	1416,34	1653,98	1507,99	1277,65	3653,68	1256,41	1111,22	3150,76	497,49	1540,64	3730,80	2168,33	2128,43	1747,93	3177,01
	SDV	250		376,46	170,41	462,12	306,59	614,62	330,01	361,47	198,07	207,34	607,71	229,09	208,20	477,36	194,20	650,77	668,40	461,86	424,75	404,70	842,46
9	EIG	250	45265,82	109,10	92,58	184,21	122,28	340,83	90,31	256,09	110,71	194,12	352,86	132,63	178,87	154,22	118,96	139,79	199,89	136,20	217,56	158,60	420,83
	AVL	250		2311,59	1893,54	3114,04	2442,58	7192,56	1746,89	5563,46	2767,04	4287,83	5893,10	2501,49	3770,79	2823,73	2450,06	2817,78	4110,48	2720,27	4091,79	2781,93	7125,05
10	VGY	250	43349,01	894,77	794,28	1883,91	1099,17	2228,44	632,16	1733,85	868,13	1610,13	2500,07	499,92	914,66	746,92	132,76	593,66	2847,20	1863,46	2118,96	852,78	2303,19
	VTS	250		928,73	804,03	1863,91	1096,35	2368,41	553,78	1809,42	906,75	1637,32	2548,60	508,70	915,33	833,40	152,97	634,54	2721,97	1847,63	2133,86	861,05	2323,06