

"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISION DE CIENCIAS E INGENIERIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUIMICO-BIOLÓGICAS
Y AGROPECUARIAS

"DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE
PEPTIDIL ARGININA DESAMINASA TIPO
IV (PADI4) Y SU RELACION CON LA ACTIVIDAD
CLINICA DE ARTRITIS REUMATOIDE

TESIS PROFESIONAL PRACTICA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO BIOLOGO CLINICO

PRESENTA

Mónica Guadalupe Matuz Flores

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISION DE CIENCIAS E INGENIERIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUIMICO BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

**"Determinación de la actividad de peptidil arginina desaminasa tipo
IV (PADI4) y su relación con la actividad clínica de artritis
reumatoide "**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Mónica Guadalupe Matuz Flores

Navojoa, Sonora

Diciembre del 2017

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se le dé él crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Jefe del Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Sonora Unidad Regional Sur (DCQBA-USON, URS)

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de datos contenidos en esta tesis deberá dar crédito al DCQBA-USON, URS, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del Director de Tesis.

M.C. Ramona Icedo García

Jefa del Depto. de Ciencias Químico-Biológicas y Agropecuarias

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Mónica Guadalupe Matuz Flores**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.



Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez

Presidente



Dr. José Guadalupe Soñanez Organís

Secretario

Dr. José Francisco Muñoz Valle

Vocal



M.C. Luis Alberto Zamora Álvarez

Suplente

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, Dr. Jesús Alfredo Rosas Rodríguez, por confiar en mí y brindarme la oportunidad de ser parte de este proyecto, por su paciencia, consejos y enseñanzas y por el apoyo brindado durante el desarrollo del proyecto, pero sobre todo por su disposición en todo momento.

A mi tutor, Dr. José Guadalupe Soñanez Organis, por brindarme sus consejos, enseñanzas y por siempre estar al pendiente de mi formación académica.

A Dr. José Francisco Muñoz Valle por sus enseñanzas, por parte de mi comité de tesis y darme la oportunidad de realizar la estancia de investigación en el Instituto de investigación en Ciencias Biomédicas en la Universidad de Guadalajara.

A M.C Luis Alberto Zamora Álvarez por contribuir a mi formación académica, así como los consejos brindados en todo momento.

A mi alma mater y cada uno de mis maestros quienes me formaron durante estos 4 años.

A Dios por darme la fortaleza y permitirme llegar a este momento.

DEDICATORIA.

Primeramente, a Dios por estar conmigo y guiarme en cada momento.

A mis padres, Liliana y Carlos, y a mi hermano José Francisco por todo sacrificio que hacen por mí, por confiar en mí y estar en cada paso de mi vida, siendo mis pilares, motivándome y apoyándome en cada una de mis decisiones, estoy infinitamente agradecida, son un gran ejemplo para mí, los amo.

A mis abuelos, Esperanza y José por ser mis segundos padres, guiarme, y darme su apoyo incondicional y amor durante toda mi vida, son mi motivación en todo momento, espero la vida me permita regresar todo lo que me dan.

A mis tíos y primos, especialmente a Norma y Rogelio por aconsejarme y apoyarme siempre y a Lupita Flores por estar siempre conmigo y ser como una hermana para mí.

A mis amigos de laboratorio, Jeravy, Juan, Arquímedes, Mariazel, José, Melissa, Jennifer, Dennise y Susana por sus enseñanzas y apoyo.

A mis amigos de carrera, especialmente a Vanessa, Andrea y Dayani por estar en cada paso, compartir su conocimiento conmigo, apoyarme, y darme ánimos para seguir adelante, gracias también a Ciara, Hazel y Ulloa por brindarme su amistad y apoyo, gracias a todas por confiar en mí, me llevo un bonito recuerdo de ustedes, las admiro y son un gran ejemplo para mí.

A mis amigos, Marcía, Vanessa R, Norma, B. Vilches y Juan Martín, por siempre creer en mí, acompañarme en momentos buenos y malos, aconsejarme y motivarme, por sus oraciones y apoyo, y a Cinthia Hernández que siempre apuesta por mí y ha sido una de las principales personas que motiva a seguir preparándome profesionalmente, cada uno de ustedes me ha enseñado grandes cosas, me han hecho fuerte y feliz, los llevo siempre conmigo.

“A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota”

-Madre Teresa de Calcuta

CONTENIDO

	Página
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	2
FORMA DE APROBACIÓN	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	7
LISTA DE TABLAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
INTRODUCCIÓN	11
ANTECEDENTES	13
Artritis Reumatoide	13
Daño estructural	14
Criterios de clasificación	14
Evaluación de la actividad clínica	17
Etiología	17
Factores ambientales	17
Factores hormonales	18
Factores genéticos	19
Epidemiología	21
Patogénesis	21
Células, citocinas y moléculas implicadas	23
Peptidil arginina desaminasas 4	24
Papel de PAD en artritis reumatoide	25
Polimorfismos	26
Localización del polimorfismo de <i>PADI4</i>	27
Actividad enzimática	28
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS	31
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS ESPECIFICOS	32
METODOLOGÍA	33

Preparación del estándar Dns-Gly-Cit.....	33
Análisis mediante HPLC y actividad de PAD	33
Determinación de Proteína	34
Análisis de datos.....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
CONCLUSIÓN	42
PERSPECTIVAS.....	43
BIBLIOGRAFÍA	44

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I. Criterios para la clasificación de AR 1987	15
Tabla II. Criterios para la clasificación de la AR del ACR/EULAR 2010	16
Tabla III. Datos obtenidos para el estándar por HPLC	39

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Mecanismos fisiopatológicos de la inflamación y la destrucción	22
Figura 2. Estructura cristalina de PADI4.....	25
Figura 3. Gen de PADI4 y localización de los SNPs asociados con AR	27
Figura 4. Cromatograma del péptido DGA 100 μ M.....	36
Figura 5. Cromatograma del péptido DGA 100 μ M con la enzima PAD a 1 hora de incubación.....	37
Figura 6. Cromatograma del péptido DGA 100 μ M con la enzima PAD a 2 horas de incubación.....	38
Figura 7. Cromatograma del péptido (DGA 100 μ M) con la enzima PAD a 4 horas de incubación.....	38
Figura 8. Curva patrón de actividad PAD	41

INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune que afecta considerablemente a la población a nivel mundial, se informó que se tiene una prevalencia de 0.5 al 1.1% (Tobon y col., 2010), aunque en México se ha reportado una prevalencia nacional del 1.6 %, no debe de tomarse de manera generalizada, debido a que existen variaciones importantes dependiendo de sus regiones geográficas. Tales fluctuaciones estimadas entre el 0.77 y el 2.8% están correlacionadas con factores ambientales y genéticos (Moreno-Montoya y col., 2015; Pelaez-Ballestas y col., 2011). Los principales hallazgos clínicos de la AR son la presencia de autoanticuerpos, tales como el factor reumatoide (RF), anticuerpos contra proteínas citrulinadas (ACPA) o anticuerpos contra péptido cíclico citrulinado (anti-CCP) (Aletaha y col., 2010) lo cual desencadena inflamación de las articulaciones diartroideas que conllevan a una erosión y daño progresivo del cartilago y hueso (Arend y Firestein, 2012). Aunque no existe una etiología exacta, se ha observado que tiene correlación con factores ambientales, hormonales y genéticos (Bae, 2010), donde se han identificado numerosos *locus* de susceptibilidad para AR. Entre los principales genes asociados destaca el gen *PADI4* que codifica para la enzima peptidil arginina desaminasa tipo IV (PADI4) la cual es la responsable de la citrulinación de las proteínas tales como vimentina, fibrinógeno, fibrina (Anzilotti y col., 2010; Bax y col., 2011; Raychaudhuri, 2010). Las enzimas peptidil arginina desaminasas (PAD) forman parte de una familia de enzimas dependientes de calcio que catalizan la conversión de residuos de arginina a residuos de citrulina. En humanos, se han encontrado cinco isotipos de PAD: PADI1, PADI2, PADI3, PADI4 y PADI6, las cuales se distribuyen en una amplia gama de células y tejidos, donde cada isotipo muestra un sitio de unión específico. PADI1 se expresa predominantemente en la epidermis y el útero, PADI2 es el isotipo mayormente difundido, expresado en músculos esqueléticos, bazo, cerebro, glándulas secretoras, PADI3 en los folículos pilosos, mientras que PADI4 en neutrófilos y eosinófilos, mientras que PADI6 en ovarios (Arita y col., 2004; Vossenaar y col., 2003). Diversos estudios han confirmado la asociación de PADI4 en distintas poblaciones como en coreano (Kang y col., 2006), chino (Fan y col., 2008), américa del norte (Plenge y col., 2005) y población del occidente de México (Guzman-Guzman y col., 2015) esta última se obtuvo que el haplotipo GTG es más frecuente en AR que en controles donde además se asocia con un incremento de niveles de ACPA y de mRNA donde se demostró que la expresión fue 3 veces mayor en

pacientes con AR que contienen el haplotipo susceptible, lo que coincide con lo reportado en población japonesa (Suzuki y col., 2003). Además en la población sur de México se obtuvo que el haplotipo GTG es más frecuente en AR que en controles por lo que se confirmó la asociación del haplotipo susceptible en esta población (Banos-Hernandez y col., 2017). Con base a lo anterior es importante la evaluación de la actividad de la enzima y así relacionarlo con la actividad clínica de la AR. En el presente trabajo se estandarizó el método por HPLC para la detección de PAD14, la cual posteriormente puede ser utilizada para evaluar muestras de neutrófilos de pacientes con AR.

ANTECEDENTES

Artritis Reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la presencia de autoanticuerpos, tales como el factor reumatoide (RF), anticuerpos contra-proteínas citrulinadas (ACPA) (Aletaha y col., 2010). La AR es una enfermedad que se caracteriza por la deformación simétrica de las articulaciones que suele afectar comúnmente a las articulaciones pequeñas de pies y manos, incluyendo la inflamación de la membrana sinovial, encargada del revestimiento de la articulación, dando como resultado la formación del *pannus*, invadiendo y destruyendo las articulaciones. Las barreras de los tejidos, no son suficientes para detener la alteración y por ende causa descomposición del cartilago y provoca la erosión de huesos (Firestein, 2003; Smolen y col., 2005).

El establecimiento de la enfermedad se inicia con el acoplamiento de células del revestimiento sinovial, que a su vez producen las quimiocinas, incluyendo el factor 1 derivado de células estromales, que atraen células al sitio articular en los que se incluyen células T, células B, células plasmáticas, células dendríticas, macrófagos, mastocitos, monocitos y linfocitos. Por lo tanto, los sinoviocitos sufren procesos hiperplásicos, por lo que las citocinas pro-inflamatorias son de suma importancia en la generación de la respuesta inflamatoria y destructiva (Firestein y Zvaifler, 2002; Smolen y col., 2005).

Daño estructural

La AR es una poliartritis que suele afectar especialmente manos, muñecas, rodillas y pies, produciendo una artritis simétrica que por lo general se produce en articulaciones interfalángicas proximales y metacarpofalángicas. Comúnmente suele presentarse rigidez matutina, dolor, tumefacción y enrojecimiento. Suelen presentarse también deformidades dentro de las más comunes se encuentra la deformidad en cuello de cisne con flexión de las interfalángicas distales e hiperextensión de las proximales, deformidad en Z con aducción excesiva del primer metacarpiano, flexión de la metacarpofalángicas hiperextensión de la interfalángica, entre otras, que en etapas graves originan incapacidad (García y Criado, 2010).

Además, la AR es una enfermedad sistémica por lo que se presentan manifestaciones extra-articulares, donde los nódulos reumatoides pueden aparecer en cualquier órgano, presentando complicaciones como pleuritis, pericarditis, vasculitis, queratoconjuntivitis y escleritis (Carretero Colomer, 2007; García y Criado, 2010).

Criterios de clasificación

Actualmente se utilizan criterios de clasificación los cuales permiten identificar entre los sujetos que padecen la enfermedad y los que no. Los criterios de 1987 del Colegio Americano de Reumatología (ACR, del inglés American College of Rheumatology) son los utilizados a nivel internacional para estandarizar los grupos de estudios con AR ya establecida, pero presentan cierta limitación ya que no permiten un diagnóstico precoz (Aletaha y col., 2010; Arnett y col., 1988).

Los criterios establecidos desde 1987 para la clasificación de AR (Tabla 1), implica una revisión médica y pruebas de laboratorio para la valoración de criterios como inflamación, afectación, y factores característicos de AR. Un paciente se considera con AR si se identifican

al menos 4 de los 7 criterios de AR, considerando que los criterios identificados deben presentarse como mínimo durante 6 semanas.

Tabla I. Criterios para la clasificación de AR 1987

CRITERIO	DEFINICIÓN
1. Rigidez matutina	Rigidez matutina en las articulaciones y alrededor de ellas con duración de al menos 1 hora.
2. Artritis en tres o más áreas articulares	Por lo menos tres áreas articulares simultáneamente afectadas, con inflamación o líquido articular observado por el médico. Las 14 áreas posibles son Interfalángicas proximales, metacarpofalángicas, muñecas, codos, rodillas, tobillos y metatarsofalángicas.
3. Artritis en las articulaciones de las manos	Por lo menos un área inflamada en muñeca, metacarpofalángicas o interfalángicas conjunta.
4. Artritis simétrica	La participación simultánea de las mismas áreas conjuntas en ambos lados del cuerpo.
5. Nódulos reumatoides	Nódulos subcutáneos, sobre prominencias óseas o superficies extensoras, o en regiones yuxtaarticulares, observadas por un médico.
6. Factor reumatoide sérico	Demostración de cantidades anormales de factor reumatoide sérico por cualquier método.
7. Cambios radiográficos	Las radiografías posteroanteriores de mano y muñeca, deben incluir erosiones o descalcificación ósea inequívoca localizada o marcada adyacente a las articulaciones involucradas.

(Arnett y col., 1988)

Los criterios de clasificación de 1987 fueron creados con el objetivo de diferenciar a los pacientes con AR de los que padecían otras enfermedades inflamatorias (lupus eritematoso generalizado, espondilitis), en donde muestran una sensibilidad y especificidad del 80 y 93% respectivamente, pero cuando es aplicada a individuos con AR en etapas tempranas su especificidad disminuye hasta un rango de 33 a 77%. Por tal motivo, EULAR (del inglés, *The*

European League Against Rheumatism) y el ACR en 2010 incorporaron los nuevos criterios de clasificación con el fin de facilitar la identificación de individuos con AR de manera temprana y clasificar a aquellos que presenten una evolución (Tabla 2). Dentro de los cambios se encuentran los reactantes de fase aguda, velocidad de sedimentación globular y proteína C reactiva (pCr), así como la valoración de los marcadores serológicos donde además de evaluar al factor reumatoide se evalúa los ACPA, los cuales se encuentran en suero en etapas temprana de la enfermedad e incluso hasta años antes del inicio de la enfermedad.

Tabla II. Criterios para la clasificación de la AR del ACR/EULAR 2010

CRITERIO	PUNTAJE
A. Afección articular	
1 articulación grande	0
2 – 3 articulaciones grandes	1
1 – 3 articulaciones pequeñas (con o sin afección de articulaciones grandes)	2
4 – 10 articulaciones pequeñas (con o sin afección de articulaciones grandes)	3
>10 articulaciones (por lo menos una articulación pequeña)	5
B. Serología	
Factor reumatoide negativo y anticuerpos contra proteínas citrulinadas negativos	0
Factor reumatoide bajo positivo o ACPA	2
Factor reumatoide alto positivo o ACPA	3
C. Reactantes de fase aguda	
pCr y VSG normales	0
pCr y VSG anormales	1
D. Duración de los síntomas	
< 6 semanas	0
≥ 6 semanas	1

Aletaha y col., 2010

Evaluación de la actividad clínica

La evaluación de la actividad clínica de la AR ha mejorado al estar constituida por pruebas de laboratorio, así como el índice de actividad de enfermedad de 28 articulaciones (DAS28), en conjunto con las pruebas de laboratorio. En ese sentido, la determinación del factor reumatoide resulta positivo en aproximadamente el 70% de los casos, pero presenta la desventaja de no ser altamente específico para AR, ya que puede ser positivo en otras enfermedades autoinmunes. A su vez, otras pruebas que están relacionadas con la intensidad de la inflamación son la VSG y la proteína C reactiva por lo que no son considerados altamente específicos para AR (Aletaha y col., 2005). Sin embargo, recientemente se han descubierto los anticuerpos contra péptidos citrulinados (anti- CCP) los cuales poseen gran utilidad en el diagnóstico, especialmente en los casos con factor reumatoide negativo. Los anticuerpos anti-CCP pueden ser detectables hasta 14 años previo al desarrollo de las manifestaciones características de la enfermedad (Nielen y col., 2006).

Etiología

Aunque no existe una etiología exacta para la AR, se conocen factores relacionados con el desarrollo de la enfermedad dentro de ellos destacan las predisposiciones genéticas, además de la participación de factores ambientales y hormonales que desencadenan la sinovitis (Bae, 2010)

Factores ambientales

El fumar es el factor de riesgo ambiental más comúnmente en AR (Vessey y col., 1987). La asociación entre el tabaquismo y la AR muestra la presencia de epítoto compartido,

ocasionando el riesgo de desarrollar ACPA, presentándose así una mayor frecuencia de factor reumatoide y ACPA en pacientes con AR (D. M. Lee y col., 2009; Linn-Rasker y col., 2006; Masdottir y col., 2000; Padyukov y col., 2004). El tabaco afecta la respuesta inmune adquirida tanto celular como humoral por lo que posee efectos pro-inflamatorios, además, posee radicales libres generando toxinas las cuales causan mutaciones (Pryor y col., 1998; Sopori y Kozak, 1998). Por otro lado se considera que el tabaquismo promueve la apoptosis y las modificaciones postraduccionales tal como la citrulinación de proteínas locales por PAD14, generando un sustrato para la activación de la respuesta inmune que da lugar a la formación de inmunocomplejos (anticuerpos anti-citrulina) que posteriormente desencadenan la respuesta inmune liberando citocinas (Klareskog y col., 2007; Klareskog y col., 2008).

Además se sugiere que puede haber una asociación de agentes infecciosos con el desarrollo de AR, entre los que se incluyen virus Epstein-Barr, retrovirus, parvovirus B19, Mycobacterium tuberculosis, basándose en la presencia en líquido sinovial o en la mayor frecuencia de serologías virales positivas, sin embargo, hasta el momento su rol es aún desconocido por lo que se piensa que puede estar relacionado en conjunto con otros factores y no desempeñando un papel independiente en el desarrollo de dicha enfermedad (McInnes y Schett, 2011; Ruiz-Esquide y Sanmarti, 2012)

Se ha demostrado que la periodontitis está asociada con AR, siendo una de las enfermedades con más frecuencia en estos sujetos, donde se sabe que su agente causal "*Porphyromonas gingivalis*" expresa a la PAD dando como resultado la citrulinación de proteínas tales como vimentina, filagrina y citoqueratina, produciendo una inflamación que se caracteriza por la presencia de citocinas provocando erosiones y destrucción de hueso periodontal (Rosenstein y col., 2004; Wegner y col., 2010)

Factores hormonales

La probabilidad de desarrollar AR es mayor en mujeres que en hombres (2-4 veces más), por lo que puede deberse a los cambios hormonales que ocurren durante el embarazo, posparto, lactancia, menopausia entre otros, mientras que en los hombres los andrógenos poseen un efecto protector, por lo que se sugiere que los estrógenos son pro-inflamatorios mientras que

los andrógenos anti-inflamatorios, lo que explica la menor prevalencia en comparación con las mujeres (Gordon y col., 1988; Linos y col., 1980; Masi y col., 1995).

Dado que se conoce que los estrógenos son pro-inflamatorios en conjunto con la rápida disminución de la función de los ovarios y estrógenos circulantes estos estimulan a las citocinas que promueven la inflamación como la IL-6 y TNF- α e IL-1 durante la menopausia (Pfeilschifter y col., 2002). Además, estudios demuestran que la prolactina induce la autoinmunidad al poseer efectos inmunoestimulantes desencadenando la AR, ya que estos inducen al déficit en el desarrollo de células B en tejidos (bazo), deteriorando la selección de células B auto-reactivas promoviendo la pérdida de la auto-tolerancia (Orbach y Shoenfeld, 2007; Peeva y col., 2003). Sin embargo, se piensa que el embarazo puede tener efecto protector en el desarrollo de AR, al aumentar la progesterona la cual actúa como antiinflamatorio (Elenkov y col., 2001; Ito y col., 1994).

Factores genéticos.

Varios estudios demuestran que los factores genéticos en conjunto con los factores hormonales y ambientales contribuyen al desarrollo de la AR hasta en un 60%, siendo el antígeno humano leucocitario (*HLA*, del inglés, Human Leukocyte Antigen) el más fuertemente asociado con la enfermedad, motivo por el cual ha sido más estudiado. Sin embargo, se han identificado genes de susceptibilidad adicionales como *PADI4*, *PTPN22* (proteína tirosina fosfatasa no receptora de tipo 22 y *STAT4* (Transductor de señal y activador de la transcripción 4), aunque estos pueden variar de acuerdo a la población (S.-C. Bae, 2010; K. P. Liao y col., 2009; McInnes y Schett, 2011).

Se ha demostrado que la susceptibilidad de la AR está relacionada con alelos *HLA-DRB1* los cuales codifican residuos de aminoácidos de una secuencia similar glutamina-arginina-arginina-alanina-alanina (QRRAA) o arginina-arginina-arginina-alanina-alanina (RRRAA) o glutamina-lisina-arginina-alanina-alanina (QKRAA) en la tercera región hipervariable de la cadena beta en las posiciones 70-74, los cuales son denominados: epítipo compartido (EC) (Gregersen y col., 1987). Los genes *HLA-DRB1* activan a los linfocitos T autoreactivos mediante la presentación de autoantígenos la cual depende de la carga de los aminoácidos que constituyen el epítipo reumatoideo donde una carga negativa favorece la

presentación de péptidos patogénicos implicados en la AR (Gorga y Monos, 1996; Wucherpfennig y Strominger, 1995). La presencia de estos alelos no solo influye como factor de riesgo para AR, sino que también incrementa la producción FR, ACPA y la severidad de la enfermedad, presentando destrucción articular y manifestaciones extraarticulares, sin embargo, puede diferir en diversas poblaciones (Hall y col., 1996; Padyukov y col., 2004; Turesson y col., 2005).

Además, se han identificado numerosos *locus* de susceptibilidad para AR entre los que destaca el gen *PADI4* que codifica para la enzima PADI4 la cual es la responsable de la citruinación (Anzilotti y col., 2010; Wucherpfennig y Strominger, 1995), siendo esta fundamental en la patogénesis de AR por medio de la generación de epítomos antigénicos, los cuales se expresan en tejido articular lo que ocasiona la afectación de articulaciones (Nakashima y col., 1999; Schellekens y col., 1998). Se identificó que un haplotipo de *PADI4* que consta de 4 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) *PADI4 89*, *PADI4 90*, *PADI4 92* y *PADI4 104* dando como resultado sustituciones de 3 aminoácidos: S55G, A82V, y A112G (el cuarto polimorfismo es silencioso) el haplotipo susceptible de *PADI4* se asocia con un incremento de los niveles de ACPA y de mRNA en diversas poblaciones (Suzuki y col., 2003) como japonesa (Ikari y col., 2005), coreana (Kang y col., 2006), norteamericana (Plenge y col., 2005), occidente y sur de México (Banos-Hernandez y col., 2017; Guzman-Guzman y col., 2015), sin embargo no es un factor de riesgo en personas con descendencia europea (Burr y col., 2010).

Por otro lado, se ha descrito al gen *PTPN22* (variante funcional de la proteína intracelular de la tirosina fosfatasa N22) como susceptible para el desarrollo de AR, aumentando dos veces más el riesgo de AR seropositiva (FR positivo y ACPA positivos) en heterocigotos y hasta 4 veces más en homocigotos (Begovich y col., 2004; A. T. Lee y col., 2005) y en población del occidente de México se demostró la asociación de los haplotipos -1123G>C/+1858C>T (OR 2.18) (Ruiz-Noa y col., 2017). Además, se ha descrito al gen *STAT4* como susceptible para AR en poblaciones europeas, el cual induce la diferenciación de linfocitos T CD4 a Th1 y Th17 involucrados en la AR (Orozco y col., 2008; Remmers y col., 2007).

Epidemiología

La AR afecta considerablemente a la población en todo el mundo, se informó que la prevalencia va del 0.5 al 1.1% (Silman y col., 1993; Tobon y col., 2010), y que aproximadamente al 0.5-1% en poblaciones de América del Norte, mientras que de 0.3-0.7% de la población de Europa del Norte y Sur se ven afectadas, a diferencia de los países en desarrollo de Asia y el Medio Oriente que afecta al 0.1-0.5% de su población, con un aumento de la prevalencia en la población de indios de América del norte del 5.3 – 6.0% (Alamanos y Drosos, 2005).

La AR afecta al 1.6% de los adultos mexicanos y es más prevalente en mujeres que en hombres con una relación mujer: hombre de 3:1 mientras que la edad donde más comúnmente se presenta es de los 30 a los 44 años, sin embargo, puede presentarse en cualquier edad. (Basra y col., 2012; Pelaez-Ballestas y col., 2011).

Patogénesis

Las citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-16, IL-17, TNF α , IFN γ), antiinflamatorias (IL-4, IL-11, IL-13) y las antagonistas, se encuentran en equilibrio en condiciones normales, sin embargo, en sujetos con AR se presenta un desequilibrio entre estas citocinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias lo que favorece la presencia de autoinmunidad (Arend, 2001). Se sugiere que la reacción inflamatoria se desencadena por un estímulo desconocido que desencadena una serie de eventos tal como la infiltración de células inflamatorias en la membrana sinovial que provocan la inflamación por células mononucleares, extendiéndose hacia el cartílago y huesos ocasionando el daño en las articulaciones (McInnes y Schett, 2011). La alteración inicial se da por medio de la infiltración de células T activadas en la membrana sinovial, que da como resultado niveles elevados de TNF α e IL-1 que promueven el reclutamiento de células al sitio de inflamación, estimulando la proliferación provocando así la formación del *pannus* que posteriormente se extiende hacia el cartílago y hueso ocasionando

el daño de las articulaciones(Pratt y col., 2009). Además, el IFN γ , TNF α e IL-1 incrementan la actividad de las NOS (sintasa del óxido nítrico) aumentando los niveles de óxido nítrico el cual activa a las metaloproteasas las cuales son enzimas que degradan los componentes de la matriz de extracelular del cartilago como proteoglicanos y colágeno tipo II e induce la apoptosis(Clancy y col., 1998)(Figura 1).

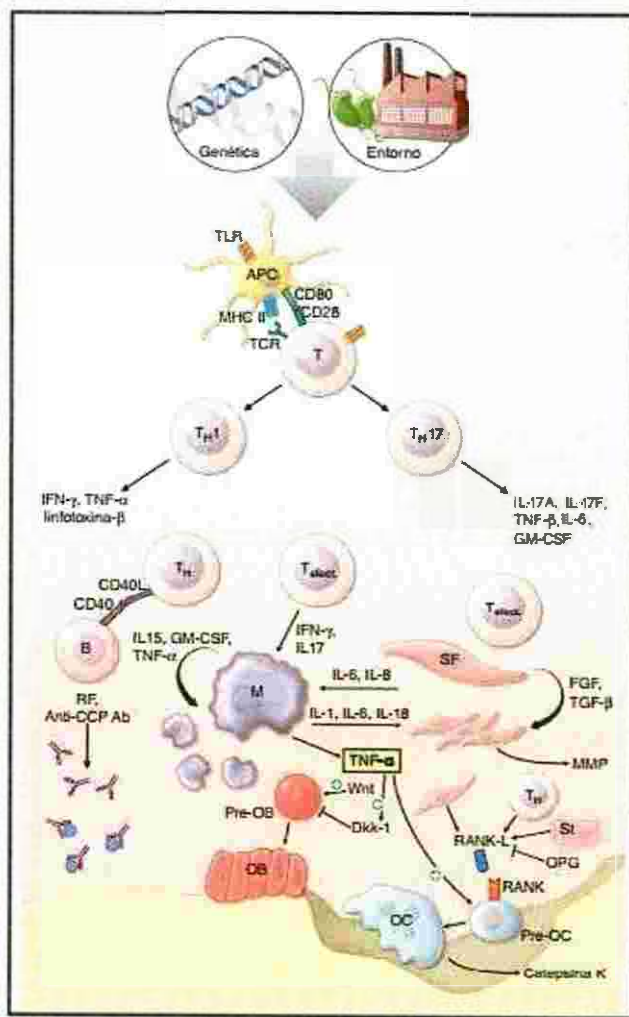


Figura 1. Mecanismos fisiopatológicos de la inflamación y la destrucción

Fuente: Harrison, 2012.

Células, citocinas y moléculas implicadas

Se ha propuesto que los ACPA están involucrados en el inicio y en la forma crónica de la AR, estos anticuerpos son dirigidos contra proteínas como fibrinógeno, colágeno tipo II, α -enolasa las cuales son citrulinadas induciendo una respuesta a antígenos. Los anticuerpos promueven la producción de citocinas pro-inflamatorias al formar complejos inmunitarios por el complemento y los receptores Fc de activación (S. Bae y col., 2012; Snir y col., 2010).

Se demostrado un aumento de células mieloides, células dendríticas, plasmocitos que expresan citocinas tales como IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, moléculas HLA de clase II, necesarias para el proceso de presentación de antígenos y activación de células T, en la membrana sinovial (Lebre y col., 2008). Las células T promueven la producción de citocinas pro-inflamatorias contribuyendo de esta manera a la inflamación, por medio de la interacción con macrófagos y fibroblastos, esta producción de citocinas probablemente se produce por receptores que reconocen proteínas de choque térmico y fibronectina por medio de receptores de reconocimiento de patrón como TLR2, TLR3, TLR4 y TLR6, los cuales se expresan durante el inicio y la forma crónica de la enfermedad (Brentano y col., 2005; McInnes y Schett, 2007).

Algunos de los mediadores de la inflamación fundamentales en la migración celular son TNF- α , IL-1 e IL-6 esta última promueve el reclutamiento de neutrófilos que a su vez contribuye a la inflamación y destrucción de la articulación, sin embargo también puede ocurrir a través de los fibroblastos (Lally y col., 2005; Smolen y col., 2007). Además, las citocinas TNF- α , IL-1 e IL-6 inducen la osteoclastogénesis a través de los macrófagos por la unión del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el receptor activador de factor nuclear (RANK) y el ligando de RANK (RANKL). M-CSF promueve la diferenciación de los osteoclastos al acoplarse al receptor M-CSFR de monocitos, mientras que RANKL se expresa a través de las células mesenquimales como las células T sinoviales. Los osteoclastos inducen la resorción ósea, provocando la invasión de células en la membrana sinovial que da lugar a la formación del *pannus* (Schett, 2007; Teitelbaum, 2000).

Peptidil arginina desaminasas 4

Las enzimas PAD forman parte de una familia de enzimas dependientes de calcio que catalizan la conversión de residuos de arginina a residuos de citrulina. Las modificaciones postraduccionales de proteínas mediante citrulinación en donde ocurre la conversión de un aminoácido cargado positivamente a uno con carga neutra (Vossenaar y col., 2003). En humanos, se han encontrado cinco isotipos de PAD diferentes, PADI1, PADI2, PADI3, PADI4 y PADI6, las cuales se distribuyen en una amplia gama de células y tejidos, donde cada isotipo muestra un sitio de unión específico. PADI1 se expresa predominantemente en la epidermis y el útero, PADI3 en los folículos pilosos, mientras que PADI4 en neutrófilos y eosinófilos. La expresión de PADI6 se ha detectado en ovarios. (Vossenaar y col., 2003). PADI2 es el isotipo mayormente difundido, expresado por ejemplo, en músculos esqueléticos, bazo, cerebro, glándulas secretoras, etc., (Arita y col., 2004). La mayoría de los isotipos PAD (1, 2, 3 y 6) se expresan únicamente en el citoplasma, mientras que PADI4, posee localización nuclear, por lo tanto, la especificidad del sustrato es distinta entre los isotipos de PAD (Hensen y Pruijn, 2014).

PADI4 está formada por 663 aminoácidos con un peso de 74 kDa. (Arita y col., 2004). PAD4 suele unirse en dos dominios: un dominio N-terminal (aminoácidos 1 - 300), caracterizado por 2 subdominios de tipo inmunoglobulina; un dominio C-terminal (aminoácidos 301 - 663), altamente conservadas entre especies (Figura 1). PADI4 es la única isoforma que posee localización nuclear, por lo tanto, aunque es localizada en el citoplasma, se puede mover al núcleo tras la activación celular (Mastronardi y col., 2006)

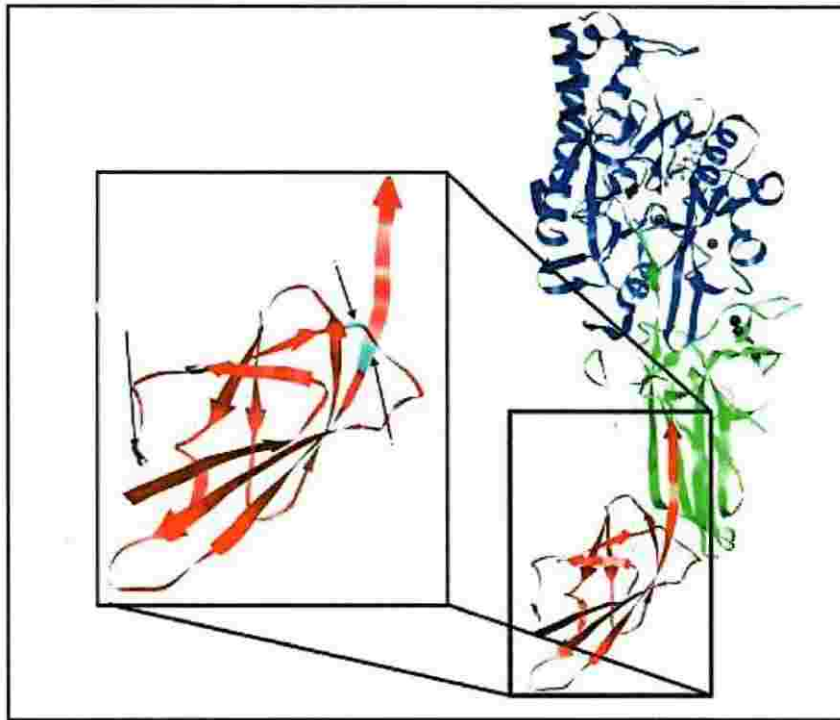


Figura 2. Estructura cristalina de PADI4

Fuente: Jones y col., 2009.

Papel de PAD en artritis reumatoide

La enzima PAD puede promover la sinovitis a través de la formación de complejos inmunes ya que esta es el objetivo de los anticuerpos de los pacientes con AR (Harris y col., 2008). Los anti-CCP son detectables en pacientes con predisposición genética hasta en un 80 % (Szodoray y col., 2010), estas proteínas citrulinadas son abundantes tanto intra como extracelularmente en la membrana sinovial de los pacientes con AR por lo que se correlacionan con una mayor destrucción de las articulaciones (Lundberg y col., 2005).

Se sugiere que PADI4 promueve la aparición y progresión de la AR al incrementar su actividad, debido a que esta se expresa en leucocitos los cuales son reclutados al sitio de

inflamación, activándose y liberando PADI4, la cual crea un neoantígeno al desaminar proteínas extracelulares, este principalmente se expresa en tejidos articulares es por ello que se caracteriza por el daño de articulaciones específicamente (Nakashima y col., 1999).

Además, la PAD puede influir también en respuesta a diversos estímulos como TNF- α , así como la liberación de NETs (trampas extracelulares de neutrófilos) lo que induce un mecanismo para la liberación de DNA genómico en el espacio extracelular, donde da como resultado una red de DNA y proteínas que se encuentra en las articulaciones de los pacientes con AR, en los que se incluyen histona, mieloperoxidasa y elastasa de neutrófilos. Puede regular la actividad de antitrombina ya que una vez citrulinado se elevan los niveles en líquido sinovial dando lugar a la angiogénesis característicos de AR (Chang y col., 2005; Neeli y col., 2008; Wang y col., 2009).

Polimorfismos

Se ha propuesto que los factores genéticos están implicados en el desarrollo de la AR, por lo que se han identificado cuatro polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) del gen *PADI4* que se asocia al desarrollo de AR en diversas poblaciones, que corresponden a PADI4_89 G>A, PADI4_90 T>C, PADI4_92 G>C Y PADI4_104 T>C en el que este último es silencioso, estos son segregados en bloque al presentar un desequilibrio de ligamiento considerándose GTG como el haplotipo susceptible y ACC como el no susceptible (Suzuki y col., 2003).

Diversos estudios confirmaron también la asociación de *PADI4* en poblaciones distintas como coreano (Kang y col., 2006), chino (Fan y col., 2008), américa del norte (Plenge y col., 2005), así como en la población mexicana (Occidente y Sur) la cual es considerada una población heterogénea resultado de la mezcla genética entre los genes europeos, amerindios, asiáticos y africanos, en la población de occidente se obtuvo que el haplotipo GTG fue el más frecuente en los pacientes con AR que en los controles por lo que se confirmó la asociación del haplotipo susceptible en esta población (OR 1.41), donde además los portadores del haplotipo GTG presentaron mayor positividad para anticuerpos anti-CCP (OR 3.27) e

incrementos en los títulos de anticuerpos anti-CCP ($p < 0.001$) (Guzman-Guzman y col., 2015). Mientras que en la población del sur de México se obtuvo que el haplotipo GTG es más frecuente en AR que en controles por lo que se confirmó la asociación del haplotipo susceptible en esta población (OR 1.36). Sin embargo al evaluar la relación entre anti-CCP y el haplotipo de susceptibilidad no se mostró ninguna asociación, como se presentó en la población de occidente de México, por lo que pueda deberse a la evolución de la enfermedad en los pacientes ya que estos presentan muchos años de evolución o se encuentran en remisión (Banos-Hernandez y col., 2017).

Localización del polimorfismo de *PADI4*

El gen *PADI4* se localiza en el brazo corto del cromosoma 1 (*locus* 1p36) y está constituido por 16 exones y 15 intrones. Los 3 SNPs de *PADI4* asociados con AR se encuentran en los exones 2 y 3 del gen y las variantes polimórficas generan un cambio de glicina (G) por serina (S) para *PADI489*, valina (V) por alanina (A) para *PADI490* y glicina (G) por alanina (A) para *PADI492* (Figura 3) (Suzuki y col., 2003).

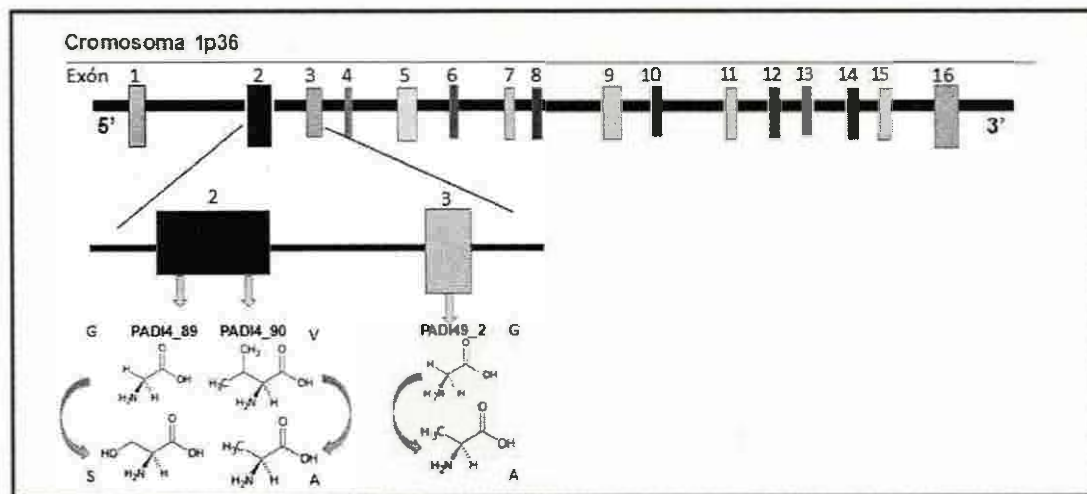


Figura 3. Gen de *PADI4* y localización de los SNPs asociados con AR

Fuente: Suzuki y col., 2003

Actividad enzimática

Las enzimas PAD requieren de cantidades elevadas de calcio para su actividad enzimática, ya que en condiciones normales son inactivos, se conoce que se activan en células muertas por el aumento del ión calcio, lo que produce la actividad y así la citrulinación de las proteínas, las cuales también pueden ser liberadas al medio extracelular, es decir la enzima en altas concentraciones de calcio ($\approx 2 \mu\text{M}$) como la que se presenta en eventos apoptóticos o necróticos cataliza la citrulinación (Vossenaar y col., 2003). Para la evaluación de la actividad enzimática de PAD por la que ocurre el proceso de citrulinación se han descrito varias técnicas, en las que se identifican a las proteínas citrulinadas y la actividad de la enzima (Hensen y Pruijn, 2014; Moscarelb y col., 2002).

Uno de los métodos para la detección de citrulina es el ensayo colorimétrico en el que un grupo ureido en condiciones acidas reacciona con DAMO (diacetilmonoxima) dando como resultado un producto color rosa/naranja al cual se lee su absorbancia de 530 nm (Fearon, 1939). Sin embargo, esta técnica fue modificada dando como resultado un producto de color amarillo con mayor estabilidad, siendo altamente reactivo con nucleófilos, su reacción se basa en la unión de DAMO y antipirina (Holm y col., 2006). Por lo anterior, este método no es recomendado para la evaluación de la actividad en muestras biológicas debido a la alta concentración de urea en tales muestras y la interferencia en la reacción con el grupo ureido (T. Chikuma y col., 2000; Hensen y Pruijn, 2014).

Otro método es el ensayo espectrofotométrico de oxidación de NADH, su principio se basa en la formación de un producto durante la citrulinación dando como resultado la formación de amoniaco el cual por medio de glutamato deshidrogenasa se une a α -cetoglutamato en presencia de NADH dando como resultado glutamato y NAD⁺ que puede ser evaluado por UV/VIS ya que se origina un cambio de absorbancia de 340 nm durante la conversión de NADH a NAD⁺. Este método no es recomendado para la determinación en muestras biológicas ya que no es capaz de detectar pequeñas cantidades de actividad de PAD (Y. F. Liao y col., 2005).

Por otro lado se ha demostrado una técnica altamente sensible para determinar la actividad de PAD en muestras complejas, aún con cantidades relativamente pequeñas (0.2 pmol), en el que su fundamento se basa en la incubación del péptido Dns-Gly-Arg (fluorescente) con la enzima PAD, originando la conversión del péptido a Dns-Gly-Cit el cual es evaluado por medio de HPLC (del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) que tiene acoplado un detector de fluorescencia en el que se mide la intensidad de fluorescencia de los diferentes péptidos (T. Chikuma y col., 2000).

JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que el nivel de expresión del mRNA de *PADI4* se incrementa en pacientes que padecen AR. A su vez, se han identificado polimorfismos genéticos que se segregan en haplotipo como los descritos en el gen *PADI4* que podrían contribuir a la actividad clínica de artritis reumatoide, en particular el haplotipo homocigoto GTG. Sin embargo, debido a que el proceso de citrulinación puede ocurrir en distintas etapas de síntesis y procesamiento de proteínas, la cantidad de péptidos citrulinados no puede ser correlacionado directamente con la expresión de mRNA, sin considerar la actividad enzimática de PADI4. Para la determinación de actividad de enzimas PAD se han desarrollado diversos métodos desde espectroscópicos, reacción con anticuerpos y analíticos como el HPLC. Con base a lo anterior se propone estandarizar el método para determinar la actividad de PADI4 mediante HPLC, para futuras evaluaciones en muestras de neutrófilos.

HIPÓTESIS.

El método de HPLC permite detectar la actividad enzimática de PADI4 con un alto límite de sensibilidad, de al menos 50 μ moles/mg de proteína.

OBJETIVO GENERAL

Estandarizar el método para determinar la actividad de PADI4 mediante HPLC con un alto límite de sensibilidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Sintetizar el péptido Dns-Gly-Cit a partir del sustrato Dns-Gly-Arg
2. Estandarizar el método para la evaluación de la actividad de PADI4 mediante HPLC.

METODOLOGÍA

Preparación del estándar Dns-Gly-Cit

Para la preparación del estándar Dns-Gly-Cit se llevó a cabo a partir del sustrato Dns-Gly-Arg utilizando una PADI recombinante (Abcam ab170409) bajo las condiciones del medio de ensayo buffer Tris-HCl 40 mM (pH 7.6), CaCl_2 2 mM, 1 mM Ditioneitol, se adicionó Dns-Gly-Arg 100 μM y 7.5 μg de enzima recombinante incubando durante 1 hora a 37°C. La reacción se detuvo incubando 10 minutos a 100°C. Se confirmó la ausencia de Dns-Gly-Arg en la solución mediante HPLC y fue considerada como solución estándar Dns-Gly-Cit 100 M (Y. F. Liao y col., 2005)

Análisis mediante HPLC y actividad de PAD

La determinación de Dns-Gly-Cit se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), en un sistema HPLC Perkin Elmer Series 200 equipado con un detector de fluorescencia Series 200^a. El análisis cromatográfico se realizó utilizando una columna C18 (150 mm x 4.6 mm). La fase móvil consistió en buffer de acetatos 100 mM conteniendo octano sulfonato de sodio 10 mM (pH4.0): acetonitrilo (75:25, v/v). La intensidad de fluorescencia se evaluó a una longitud de onda de excitación de 333 nm y capturada a una longitud de onda de 533 nm.

La evaluación de actividad de PAD fue determinada mediante la técnica reportada por Toshiyuki Chikuma y col. (2000) basada en la conversión del péptido Dansil Glicil -L- Citrulina (Dns-Gly-Cit) liberado por la actividad enzimática a partir del sustrato Dansil Glicil Arginina (Dns-Gly-Arg) (GenScript Biotech). La generación del péptido Dns-Gly-Cit se evaluó mediante HPLC y detección por fluorescencia. El medio de ensayo consistió en buffer Tris-HCl 40 mM (pH 7.6), CaCl_2 2 mM, 1 mM Ditioneitol, adicionando el sustrato Dns-Gly-Arg (en un rango de

concentraciones de 20 μM a 1 mM, en un volumen final de reacción de 50 μL . Posterior a la adición del extracto con actividad PAD, se incubó a 37°C y se detuvo la reacción a diferentes tiempos de reacción, incubando a 100°C durante 10 minutos. La muestra fue centrifugada a 4°C por 10 minutos y se inyectaron por triplicado 20 μL para su análisis mediante HPLC.

Para la expresión de la actividad de PAD en $\mu\text{moles}/\text{min}/\mu\text{g}$ proteína, se integró el área de cada uno de los picos correspondientes al péptido Dns-Gly-Cit en los diferentes tiempos de incubación. Así mismo, se consideró la concentración de proteína total de cada muestra, para obtener la actividad específica. El área obtenida del péptido control a las 4 horas de incubación, se consideró como 100 μM y por lo tanto, fue el valor más alto de área utilizado como referencia. Para la curva patrón, se utilizó el área correspondiente para cada tiempo de incubación.

Determinación de Proteína

La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford (Kit Quick star Bradford proteína assay de BIO-RAD). Adicionando 20 μL de extracto en 1 mL de reactivo de Bradford y registrando la absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro UV/VIS a temperatura ambiente (25 °C). (Zendman y col., 2007)

Análisis de datos

Los picos de emisión de fluorescencia fueron descritos en unidades de fluorescencia arbitraria identificando el patrón de emisión para Dns-Gly-Arg y Dns-Gly-Cit. La intensidad y área de cada pico se consideró para estimar la concentración de cada péptido. La concentración de Dns-Gly-Cit a los diferentes tiempos de reacción se analizó para determinar la actividad enzimática de cada muestra respecto al control utilizando el software RJ Leatherbarrow, GraFit v4.0 (Erithacus Software Ltd, Staines, UK).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis y estandarización del péptido control (Dns-Gly-Cit).

La evaluación de actividad de PADI4 mediante HPLC reportada por Toshiyuki Chikuma y col. (2000), representa una de las más sensibles respecto a las diversas técnicas para evaluación de la conversión del péptido Dansil Glicil Arginina (Dns-Gly-Arg) a Dansil Glicil -L- Citrulina (Dns-Gly-Cit). Sin embargo, requiere de una estandarización para cada una de las lecturas en muestras biológicas. En este sentido se realizó la síntesis y estandarización del péptido Dns-Gly-Cit.

La inyección del péptido Dns-Gly-Arg al equipo de cromatografía, bajo las condiciones descritas en la metodología, proporciona un cromatograma de referencia del péptido sin citrulinar. El cromatograma presenta dos picos de elución, el primero al tiempo 2.127 min y el segundo a 7.227 min, con un área de 19884.8267 y 306879.088 conteo por minuto respectivamente, lo que coincide con lo reportado por Chikuma y col (2000) en donde se obtiene una señal correspondiente para DGA al mismo tiempo de retención. (Figura 4). Las muestras fueron inyectadas al equipo por triplicado confirmando así que la señal obtenida es definida. Lo anterior demuestra la reproducibilidad del método. El tiempo de corrida para la elución del péptido DGA fue de 15 minutos sin embargo los picos son eluidos en un menor tiempo por lo que el tiempo de corrida podría ser disminuido.

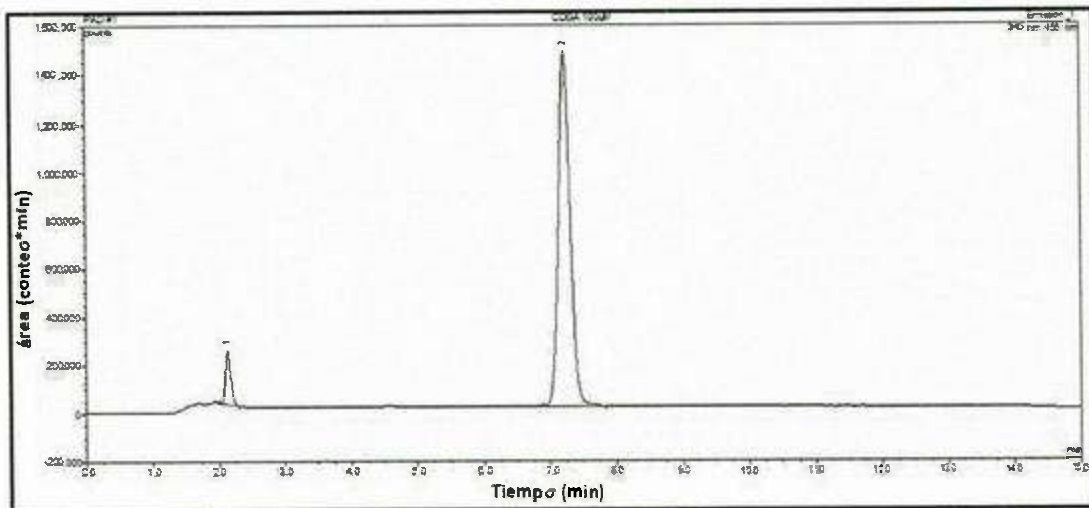


Figura 4. Cromatograma del péptido DGA 100 μ M.

Para evaluar la conversión del péptido Dns-Gly-Arg, se incubó durante 1 hora en presencia de la enzima PAD recombinante. Los resultados en el cromatograma, en contraste con el cromatograma del péptido sin citrulinar, muestran una única y nueva señal indicada por la flecha al minuto 3.32, con un área significativa de 47147.1867 conteo por minuto. El pico (indicado con la flecha) corresponde entonces al péptido citrulinado y su área puede ser utilizada para la descripción de la actividad de PAD recombinante para la conversión de Dns-Gly-Arg a Dns-Gly-Cit (Figura 5).

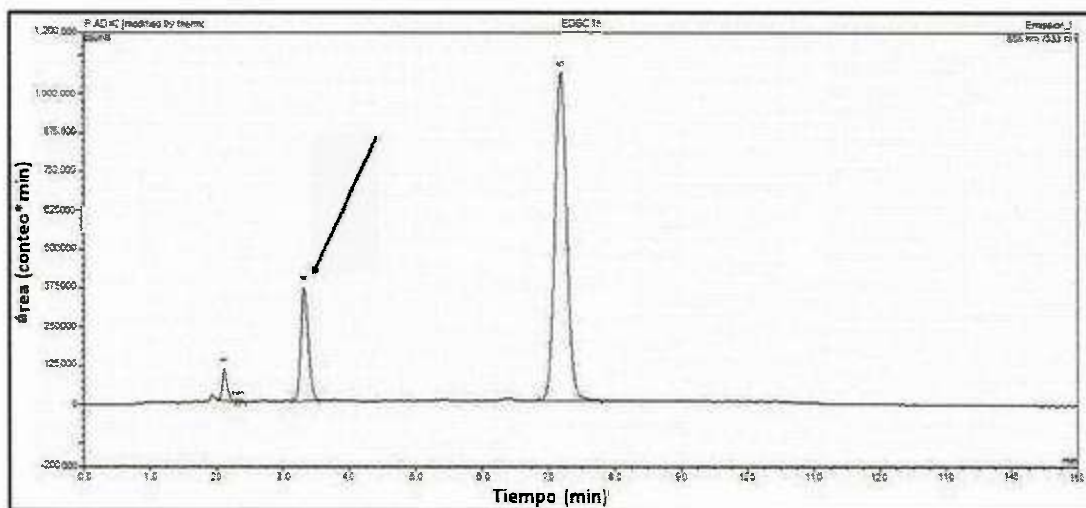


Figura 5. Cromatograma del péptido DGA 100 μ M con la enzima PAD a 1 hora de incubación.

Posteriormente, se obtuvieron cromatogramas de incubaciones de 2 y 4 horas (Figura 6 y 7), en donde se obtuvo un incremento del pico (indicado por la flecha) al mismo tiempo de retención, con áreas de 79062.315 y 92618.86 conteos por minuto respectivamente cuya área fue dependiente del tiempo de incubación con la enzima PAD recombinante. Lo anterior, sugiere que a mayor tiempo de reacción ocurre mayor citrulinación. La relación entre el tiempo de reacción y la actividad de PAD fue probada de 1 a 4 horas para el estándar, donde el nivel máximo de conversión detectable de DGA a DGC fue a las 4 horas considerándose como estándar 100 μ M y equivalente al 100 %. En comparación con los tiempos de incubación de 1 y 2 horas, se observó una actividad 49.1% y 14.63% menor respectivamente (Tabla 3).

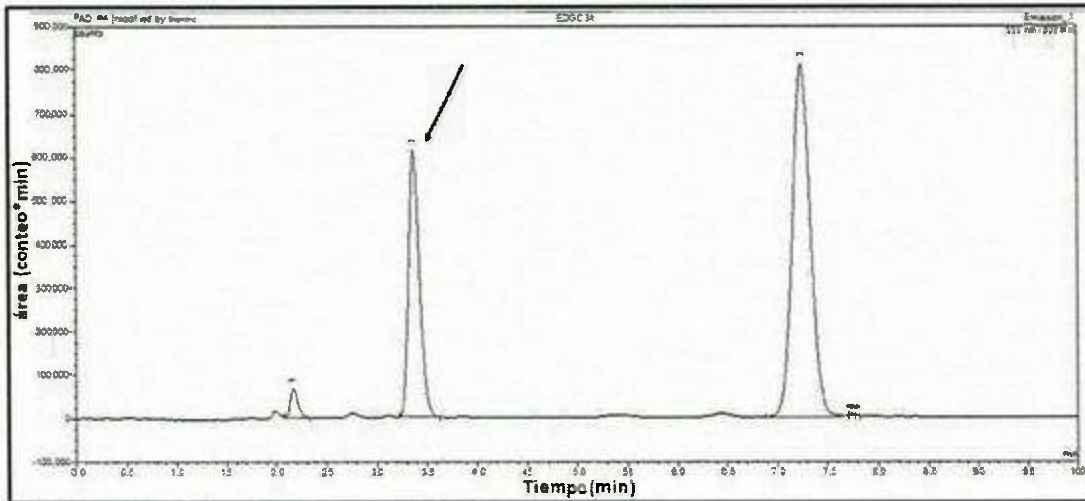


Figura 6. Cromatograma del péptido DGA 100 μ M con la enzima PAD a 2 horas de incubación.

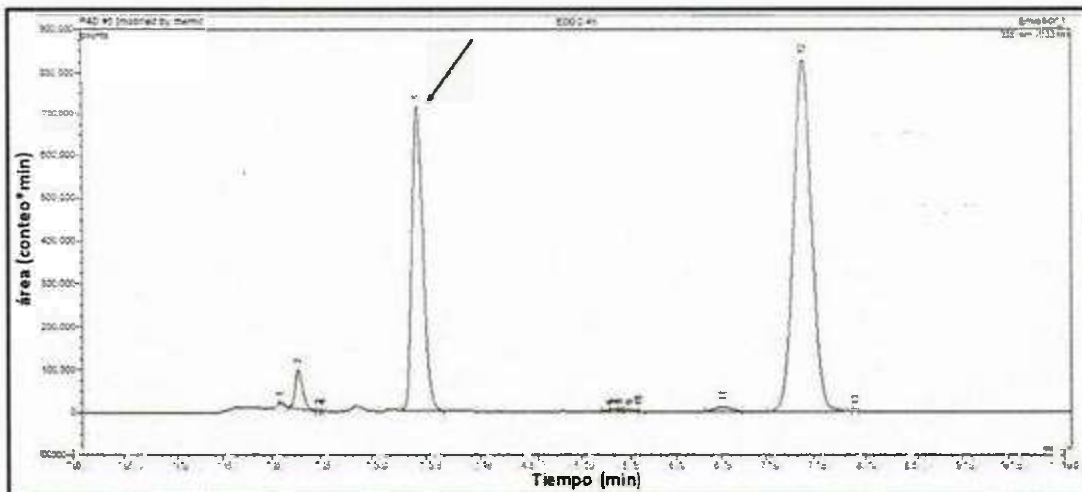


Figura 7. Cromatograma del péptido (DGA 100 μ M) con la enzima PAD a 4 horas de incubación.

Lo anterior coincide con lo reportado por Chikuma y col (2000), donde el pico de elución correspondiente para DGA es aproximadamente a los 7 minutos, sin embargo en su estudio la señal correspondiente para DGA sobrepasa el límite de detección del equipo, mientras que en nuestro grupo de trabajo nos fue posible ajustar la concentración a una señal dentro del límite del equipo, sin embargo esta señal no disminuye en gran medida, aun y cuando la señal del péptido DGA es muy alta, el disminuir la concentración del péptido por debajo del 100 μM afecta la sensibilidad de la detección de DGA (datos no mostrados). Además, el pico correspondiente a DGC en su estudio es aproximadamente a los 5 minutos para el péptido puro, mientras que nuestros resultados indican que DGC eluye a los 3 minutos aproximadamente. Por otro lado, los picos obtenidos a los 2 minutos corresponden a impurezas presente en las muestras.

Tabla III. Datos obtenidos para el estándar por HPLC.

<i>Etiqueta</i>	<i>Tiempo de incubación</i>	<i>Dns-Gly-Cit</i> <i>Tiempo retención</i> <i>3.32 min</i>	<i>Dns-Gly-Arg</i> <i>Tiempo de retención</i> <i>7.22 min</i>
<i>Área (conteo/minuto)</i>			
<i>CDGA</i>	1 hora	No aplica	306879.088
<i>EDGC</i>	1 hora	47147.1867	221700.73
<i>EDGC</i>	2 horas	79062.315	169091.858
<i>EDGC</i>	4 horas	92618.86	173749.9

El tiempo de retención y la integración de área del pico de Dns-Gly-Cit es similar al estudio realizado por Chikuma y col (2000), en el que utilizaron lisados de células HL-60 de cerebro de rata las cuales se sembraron a una densidad de 3×10^{-5} células / mL y se rompieron por congelación - descongelación y los lisados fueron utilizados como enzima, produciendo un pico significativo en 4.5 min, aproximadamente 1 minuto después, comparado con nuestros

resultados de la evaluación del estándar. Además, a las 4 horas obtuvimos el pico con el nivel más alto correspondiente a DGC, sin embargo, se sugiere evaluar a mayor tiempo para comprobar hasta qué tiempo la señal sigue incrementando.

Se construyó la curva patrón con los diferentes tiempos de incubación de 30 a 120 minutos, así como la integración del área de cada pico correspondiente a los diferentes tiempos de incubación con la enzima, donde presentó un comportamiento lineal cuya correlación fue de 0.9973 (Figura 8). Además, la ecuación de la línea recta que obtuvimos de la curva patrón ($Y = mx + b$) donde el valor del intercepto es de 0.03471 lo que nos permite detectar actividad con este límite de sensibilidad, en donde para el estándar obtuvimos valores de 1.1077 a 5.1227 $\mu\text{moles/mL}$ sin embargo, esta sensibilidad es de suma importancia para las evaluaciones en lisados celulares. Por lo anterior, el proceso de citrulinación pudo ser monitoreado en este rango de tiempo con una detección de actividad de PADI4 de 0.4 - 2.04 $\mu\text{moles}/\mu\text{g}$ de proteína. Por lo que se demuestra que el método para la detección de la actividad de PADI4 es altamente sensible, lo cual coincide con el estudio de Zendman y col (2007), donde se ha mostrado una sensibilidad similar a la observada por el método aplicado en HPLC en el que se basa en el uso de anticuerpos para la detección del producto de reacción, detectando actividad de PAD en tejido fresco de ratones, por lo que puede ser utilizada posteriormente en muestras de otros tejidos. Contrario a estos resultados se ha reportado en el estudio de evaluación por medio de ensayo espectrofotométrico de Liao y col (2005) en donde fue posible detectar actividad de PADI4, pero no fue posible detectar pequeñas cantidades de actividad, lo que confirma que el método de HPLC es más sensible para la evaluación de actividad en muestras biológicas.

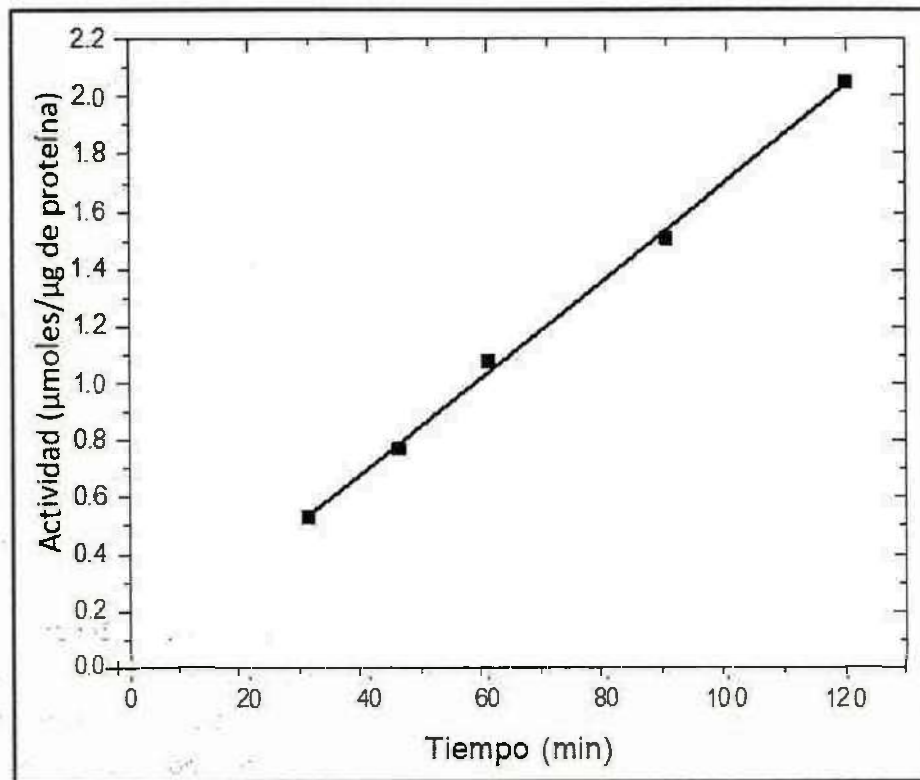


Figura 8. Curva patrón de actividad PAD

CONCLUSIÓN

El método para la detección de la actividad de PADI4 mediante HPLC permite la detección entre 0.4 - 2.04 $\mu\text{moles}/\mu\text{g}$ de proteína y un límite de sensibilidad de al menos 0.03471 $\mu\text{moles}/\mu\text{g}$ de proteína. Lo anterior, representa un método preciso y sensible para la determinación de actividad PADI4, esto aporta una posible herramienta para la realización de estudios posteriores en muestras biológicas de pacientes con AR.

PERSPECTIVAS

- Se requieren estudios posteriores en los cuales se determine actividad de PADI4 en muestras de neutrófilos de pacientes, así como si existe una asociación de la actividad con el polimorfismo *PADI4* en pacientes con AR de la región norte de México, con la finalidad de relacionar la importancia del polimorfismo con las distintas regiones del país.
- Evaluar la actividad enzimática en muestras de neutrófilo de pacientes portadores del haplotipo GTG. (Considerar mantener viabilidad de las muestras, medio de cultivo de conservación, condiciones óptimas de pH y temperatura para evitar degradación de la enzima).
- Probar actividad a diferentes tiempos de reacción para confirmar el nivel máximo de detección.

BIBLIOGRAFÍA

- Alamanos Y, Drosos AA. 2005. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 4(3), 130-136.
- Aletaha D, Nell VP, Stamm T, Uffmann M, Pflugbeil S, Machold K, Smolen JS. 2005. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis Res Ther*, 7(4), R796-806.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Menard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawski-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G. 2010. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*, 62(9), 2569-2581.
- Anzilotti C, Pratesi F, Tommasi C, Migliorini P. 2010. Peptidylarginine deiminase 4 and citrullination in health and disease. *Autoimmun Rev*, 9(3), 158-160.
- Arend WP. 2001. Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of interleukin-1 receptor antagonist. *Semin Arthritis Rheum*, 30(5 Suppl 2), 1-6.
- Arend WP, Firestein GS. 2012. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. *Nat Rev Rheumatol*, 8(10), 573-586.
- Arita K, Hashimoto H, Shimizu T, Nakashima K, Yamada M, Sato M. 2004. Structural basis for Ca(2+)-induced activation of human PAD4. *Nat Struct Mol Biol*, 11(8), 777-783.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 31(3), 315-324.
- Bae S-C. 2010. Epidemiology and etiology of rheumatoid arthritis. *J Korean Med Assoc*, 53(10), 843-852.

- Bae S, Kim H, Lee N, Won C, Kim HR, Hwang YI, Song YW, Kang JS, Lee WJ. 2012. alpha-Enolase expressed on the surfaces of monocytes and macrophages induces robust synovial inflammation in rheumatoid arthritis. *J Immunol*, 189(1), 365-372.
- Banos-Hernandez CJ, Navarro-Zarza JE, Parra-Rojas I, Vazquez-Villamar M, Ramon Padilla-Gutierrez J, Valle Y, Reyes-Castillo Z, Magdalena Torres-Carrillo N, Garcia-Arellano S, Brennan-Bourdon LM, Munoz-Valle JF. 2017. PADI4 polymorphisms and the functional haplotype are associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility: A replication study in a Southern Mexican population. *Hum Immunol*.
- Basra G, Jajoria P, Gonzalez E. 2012. Rheumatoid arthritis and Swine influenza vaccine: a case report. *Case Rep Rheumatol*, 2012, 785028.
- Bax M, van Heemst J, Huizinga TW, Toes RE. 2011. Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Immunogenetics*, 63(8), 459-466.
- Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, Ardlie KG, Huang Q, Smith AM, Spoerke JM, Conn MT, Chang M, Chang SY, Saiki RK, Catanese JJ, Leong DU, Garcia VE, McAllister LB, Jeffery DA, Lee AT, Batliwalla F, Remmers E, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Amos CI, Sninsky JJ, Gregersen PK. 2004. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*, 75(2), 330-337.
- Brentano F, Kyburz D, Schorr O, Gay R, Gay S. 2005. The role of Toll-like receptor signalling in the pathogenesis of arthritis. *Cell Immunol*, 233(2), 90-96.
- Burr ML, Naseem H, Hinks A, Eyre S, Gibbons LJ, Bowes J, Wilson AG, Maxwell J, Morgan AW, Emery P, Steer S, Hocking L, Reid DM, Wordsworth P, Harrison P, Thomson W, Worthington J, Barton A. 2010. PADI4 genotype is not associated with rheumatoid arthritis in a large UK Caucasian population. *Ann Rheum Dis*, 69(4), 666-670.
- Carretero Colomer M. 2007. Artritis reumatoide: nuevas perspectivas farmacológicas. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 26(4), 124-125.
- Clancy RM, Amin AR, Abramson SB. 1998. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. *Arthritis Rheum*, 41(7), 1141-1151.
- Chang X, Yamada R, Sawada T, Suzuki A, Kochi Y, Yamamoto K. 2005. The inhibition of antithrombin by peptidylarginine deiminase 4 may contribute to pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 44(3), 293-298.

- Chikuma T, Yamada M, Tsuda A, Yamamoto M, Nakashima K, Yajima R, Kato T. 2000. A highly sensitive high-performance liquid chromatography– fluorometric method for the assay of peptidylarginine deiminase activity. *Anal Biochem*, 285(2), 230-234.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Bakalov VK, Link AA, Dimitrov MA, Fisher S, Crane M, Kanik KS, Chrousos GP. 2001. IL-12, TNF-alpha, and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(10), 4933-4938.
- Fan LY, Wang WJ, Wang Q, Zong M, Yang L, Zhang H, Sun LS, Lu TB, Han J. 2008. A functional haplotype and expression of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Chinese. *Tissue Antigens*, 72(5), 469-473.
- Fearon WR. 1939. The carbamido diacetyl reaction: a test for citrulline. *Biochem J*, 33(6), 902-907.
- Firestein GS. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423(6937), 356-361.
- Firestein GS, Zvaifler NJ. 2002. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?: II. T cell-independent mechanisms from beginning to end. *Arthritis Rheum*, 46(2), 298-308.
- García VV, Criado AB. 2010. ¿ El control precoz de la artritis reumatoide augura un mejor pronóstico a largo plazo? *Reumatol Clin*, 6(2), 106-110.
- Gordon D, Beastall GH, Thomson JA, Sturrock RD. 1988. Prolonged hypogonadism in male patients with rheumatoid arthritis during flares in disease activity. *Br J Rheumatol*, 27(6), 440-444.
- Gorga JC, Monos D. 1996. HLA and disease: molecular basis. *MHC Molecules: Expression, Assembly and Function*, 135-162.
- Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. 1987. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 30(11), 1205-1213.
- Guzman-Guzman IP, Reyes-Castillo Z, Munoz-Barrios S, Ruiz-Noa Y, Martínez-Bonilla GE, Parra-Rojas I, Palafox-Sanchez CA, Munoz-Valle JF. 2015. Polymorphisms and functional haplotype in PADI4: further evidence for contribution on rheumatoid arthritis susceptibility and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in a western Mexican population. *Immunol Lett*, 163(2), 214-220.

- Hall FC, Weeks DE, Camilleri JP, Williams LA, Amos N, Darke C, Gibson K, Pile K, Wordsworth BP, Jessop JD. 1996. Influence of the HLA-DRB1 locus on susceptibility and severity in rheumatoid arthritis. *QJM*, 89(11), 821-829.
- Harris ML, Darrach E, Lam GK, Bartlett SJ, Giles JT, Grant AV, Gao P, Scott WW, Jr., El-Gabalawy H, Casciola-Rosen L, Barnes KC, Bathon JM, Rosen A. 2008. Association of autoimmunity to peptidyl arginine deiminase type 4 with genotype and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 58(7), 1958-1967.
- Hensen SM, Pruijn GJ. 2014. Methods for the detection of peptidylarginine deiminase (PAD) activity and protein citrullination. *Mol Cell Proteomics*, 13(2), 388-396.
- Holm A, Rise F, Sessler N, Sollid LM, Undheim K, Fleckenstein B. 2006. Specific modification of peptide-bound citrulline residues. *Anal Biochem*, 352(1), 68-76.
- Ikari K, Kuwahara M, Nakamura T, Momohara S, Hara M, Yamanaka H, Tomatsu T, Kamatani N. 2005. Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: a replication study. *Arthritis Rheum*, 52(10), 3054-3057.
- Ito A, Imada K, Sato T, Kubo T, Matsushima K, Mori Y. 1994. Suppression of interleukin 8 production by progesterone in rabbit uterine cervix. *Biochem J*, 301 (Pt 1), 183-186.
- Kang CP, Lee HS, Ju H, Cho H, Kang C, Bae SC. 2006. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans. *Arthritis Rheum*, 54(1), 90-96.
- Klareskog L, Padyukov L, Alfredsson L. 2007. Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol*, 19(1), 49-54.
- Klareskog L, Ronnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. 2008. Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*, 26, 651-675.
- Lally F, Smith E, Filer A, Stone MA, Shaw JS, Nash GB, Buckley CD, Rainger GE. 2005. A novel mechanism of neutrophil recruitment in a coculture model of the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*, 52(11), 3460-3469.
- Lebre MC, Jongbloed SL, Tas SW, Smeets TJ, McInnes IB, Tak PP. 2008. Rheumatoid arthritis synovium contains two subsets of CD83-DC-LAMP- dendritic cells with distinct cytokine profiles. *Am J Pathol*, 172(4), 940-950.
- Lee AT, Li W, Liew A, Bombardier C, Weisman M, Massarotti EM, Kent J, Wolfe F, Begovich AB, Gregersen PK. 2005. The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-dependent manner but not with HLA-SE status. *Genes Immun*, 6(2), 129-133.

- Lee DM, Phillips R, Hagan EM, Chibnik LB, Costenbader KH, Schur PH. 2009. Quantifying anti-cyclic citrullinated peptide titres: clinical utility and association with tobacco exposure in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 68(2), 201-208.
- Liao KP, Alfredsson L, Karlson EW. 2009. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 21(3), 279-283.
- Liao YF, Hsieh HC, Liu GY, Hung HC. 2005. A continuous spectrophotometric assay method for peptidylarginine deiminase type 4 activity. *Anal Biochem*, 347(2), 176-181.
- Linn-Rasker SP, van der Helm-van Mil AH, van Gaalen FA, Kloppenburg M, de Vries RR, le Cessie S, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. 2006. Smoking is a risk factor for anti-CCP antibodies only in rheumatoid arthritis patients who carry HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Ann Rheum Dis*, 65(3), 366-371.
- Linos A, Worthington JW, O'Fallon WM, Kurland LT. 1980. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota: a study of incidence, prevalence, and mortality. *Am J Epidemiol*, 111(1), 87-98.
- Lundberg K, Nijenhuis S, Vossenaar ER, Palmblad K, van Venrooij WJ, Klareskog L, Zendman AJ, Harris HE. 2005. Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. *Arthritis Res Ther*, 7(3), R458-467.
- Masdottir B, Jonsson T, Manfreddottir V, Vikingsson A, Brekkan A, Valdimarsson H. 2000. Smoking, rheumatoid factor isotypes and severity of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 39(11), 1202-1205.
- Masi AT, Feigenbaum SL, Chatterton RT. 1995. Hormonal and pregnancy relationships to rheumatoid arthritis: convergent effects with immunologic and microvascular systems. *Semin Arthritis Rheum*, 25(1), 1-27.
- Mastrorad FG, Wood DD, Mei J, Rajmakers R, Tseveleki V, Dosch HM, Probert L, Casaccia-Bonnel P, Moscarelo MA. 2006. Increased citrullination of histone H3 in multiple sclerosis brain and animal models of demyelination: a role for tumor necrosis factor-induced peptidylarginine deiminase 4 translocation. *J Neurosci*, 26(44), 11387-11396.
- McInnes IB, Schett G. 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, 7(6), 429-442.
- McInnes IB, Schett G. 2011. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 365(23), 2205-2219.

- Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Sanin LH, Perez-Barbosa L, Trejo-Valdivia B, Santana N, Goycochea-Robles MV, Cardiel MH, Riega-Torres J, Maradiaga M, Burgos-Vargas R, Pelaez-Ballestas I. 2015. Association of regional and cultural factors with the prevalence of rheumatoid arthritis in the Mexican population: a multilevel analysis. *J Clin Rheumatol*, 21(2), 57-62.
- Moscarello MA, Pritzker L, Mastronardi FG, Wood DD. 2002. Peptidylarginine deiminase: a candidate factor in demyelinating disease. *J Neurochem*, 81(2), 335-343.
- Nakashima K, Hagiwara T, Ishigami A, Nagata S, Asaga H, Kuramoto M, Senshu T, Yamada M. 1999. Molecular characterization of peptidylarginine deiminase in HL-60 cells induced by retinoic acid and 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3). *J Biol Chem*, 274(39), 27786-27792.
- Neeli I, Khan SN, Radic M. 2008. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J Immunol*, 180(3), 1895-1902.
- Nielen MM, van Schaardenburg D, Lems WF, van de Stadt RJ, de Koning MH, Reesink HW, Habibuw MR, van der Horst-Bruinsma IE, Twisk JW, Dijkmans BA. 2006. Vitamin D deficiency does not increase the risk of rheumatoid arthritis: comment on the article by Merlino et al. *Arthritis Rheum*, 54(11), 3719-3720.
- Orbach H, Shoenfeld Y. 2007. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*, 6(8), 537-542.
- Orozco G, Alizadeh BZ, Delgado-Vega AM, Gonzalez-Gay MA, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Fernandez-Gutierrez B, Gonzalez-Escribano MF, Petersson IF, van Riel PL, Barrera P, Coenen MJ, Radstake TR, van Leeuwen MA, Wijmenga C, Koeleman BP, Alarcon-Riquelme M, Martin J. 2008. Association of STAT4 with rheumatoid arthritis: a replication study in three European populations. *Arthritis Rheum*, 58(7), 1974-1980.
- Padyukov L, Silva C, Stolt P, Alfredsson L, Klareskog L. 2004. A gene-environment interaction between smoking and shared epitope genes in HLA-DR provides a high risk of seropositive rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 50(10), 3085-3092.
- Peeva E, Michael D, Cleary J, Rice J, Chen X, Diamond B. 2003. Prolactin modulates the naive B cell repertoire. *J Clin Invest*, 111(2), 275-283.
- Pelaez-Ballestas I, Sanin LH, Moreno-Montoya J, Alvarez-Nemegyei J, Burgos-Vargas R, Garza-Elizondo M, Rodriguez-Amado J, Goycochea-Robles MV, Madariaga M, Zamudio J, Santana N, Cardiel MH. 2011. Epidemiology of the rheumatic diseases in

- Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology. *J Rheumatol Suppl*, 86, 3-8.
- Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, Schatz H. 2002. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev*, 23(1), 90-119.
- Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, Purcell S, Lee AT, Karlson EW, Wolfe F, Kastner DL, Alfredsson L, Altshuler D, Gregersen PK, Klareskog L, Rioux JD. 2005. Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am J Hum Genet*, 77(6), 1044-1060.
- Pratt AG, Isaacs JD, Matthey DL. 2009. Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 23(1), 37-48.
- Pryor WA, Stone K, Zang LY, Bermudez E. 1998. Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage. *Chem Res Toxicol*, 11(5), 441-448.
- Raychaudhuri S. 2010. Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 22(2), 109-118.
- Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, de Bakker PI, Le JM, Lee HS, Batliwalla F, Li W, Masters SL, Booty MG, Carulli JP, Padyukov L, Alfredsson L, Klareskog L, Chen WW, Amos CI, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Gregersen PK. 2007. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*, 357(10), 977-986.
- Rosenstein ED, Greenwald RA, Kushner LJ, Weissmann G. 2004. Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation*, 28(6), 311-318.
- Ruiz-Esquide V, Sanmarti R. 2012. Tobacco and other environmental risk factors in rheumatoid arthritis. *Reumatol Clin*, 8(6), 342-350.
- Ruiz-Noa Y, Padilla-Gutierrez JR, Hernandez-Bello J, Palafox-Sanchez CA, Valle Y, Oregon-Romero E, Pereira-Suarez AL, Bernard-Medina AG, Munoz-Valle JF. 2017. Association of PTPN22 Haplotypes (-1123G>C/+1858C>T) with Rheumatoid Arthritis in Western Mexican Population. *Int J Genomics*, 2017, 8753498.
- Schellekens GA, de Jong BA, van den Hoogen FH, van de Putte LB, van Venrooij WJ. 1998. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*, 101(1), 273-281.

his 18004

- Schett G. 2007. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Osteoclasts. *Arthritis Res Ther*, 9(1), 203.
- Silman AJ, Hochberg MC, Cooper C. (1993). *Epidemiology of the rheumatic diseases*. Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. 2007. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *Lancet*, 370(9602), 1861-1874.
- Smolen JS, Redlich K, Zwerina J, Aletaha D, Steiner G, Schett G. 2005. Pro-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis: pathogenetic and therapeutic aspects. *Clin Rev Allergy Immunol*, 28(3), 239-248.
- Snir O, Widhe M, Hermansson M, von Spee C, Lindberg J, Hensen S, Lundberg K, Engstrom A, Venables PJ, Toes RE, Holmdahl R, Klareskog L, Malmstrom V. 2010. Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum*, 62(1), 44-52.
- Sopori ML, Kozak W. 1998. Immunomodulatory effects of cigarette smoke. *J Neuroimmunol*, 83(1-2), 148-156.
- Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. 2003. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet*, 34(4), 395-402.
- Szodoray P, Szabo Z, Kapitany A, Gyetvai A, Lakos G, Szanto S, Szucs G, Szekanecz Z. 2010. Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 9(3), 140-143.
- Teitelbaum SL. 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289(5484), 1504-1508.
- Tobon GJ, Youinou P, Saraux A. 2010. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 9(5), A288-292.
- Turesson C, Schaid DJ, Weyand CM, Jacobsson LT, Goronzy JJ, Petersson IF, Sturfelt G, Nyhall-Wahlin BM, Truedsson L, Dechant SA, Matteson EL. 2005. The impact of HLA-DRB1 genes on extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 7(6), R1386-1393.

- Vessey MP, Villard-Mackintosh L, Yeates D. 1987. Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis. *Contraception*, 35(5), 457-464.
- Vossenaar ER, Zendman AJ, van Venrooij WJ, Pruijn GJ. 2003. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays*, 25(11), 1106-1118.
- Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, Allis CD, Coonrod SA. 2009. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*, 184(2), 205-213.
- Wegner N, Wait R, Sroka A, Eick S, Nguyen KA, Lundberg K, Kinloch A, Culshaw S, Potempa J, Venables PJ. 2010. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 62(9), 2662-2672.
- Wucherpfennig KW, Strominger JL. 1995. 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*, 181(5), 1597-1601.
- Zendman AJ, Raijmakers R, Nijenhuis S, Vossenaar ER, Tillaart M, Chirivi RG, Raats JM, van Venrooij WJ, Drijfhout JW, Pruijn GJ. 2007. ABAP, antibody-based assay for peptidylarginine deiminase activity. *Anal Biochem*, 369(2), 232-240.