



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PAD2 Y PAD4 EN ARTRITIS REUMATOIDE

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

OLIVARES MARTÍNEZ ELIZABETH

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS GUILLERMO LLORENTE PETERS
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 28 de septiembre de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **OLIVARES MARTÍNEZ ELIZABETH** con número de cuenta **96064423** con la tesis titulada **"REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PAD2 Y PAD4 EN ARTRITIS REUMATOIDE"**, realizada bajo la dirección del **DR. LUIS GUILLERMO LLORENTE PETERS**:

Presidente: DRA. SELVA LUCÍA RIVAS ARANCIBIA
Vocal: DR. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO
Secretario: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
Suplente: DR. RUBÉN BURGOS VARGAS
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 27 de octubre de 2015



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por permitirme desarrollar profesionalmente

Al CONACYT por la beca 233814 otorgada durante la realización de mis estudios de posgrado

A mi comité tutor:

Al Dr. Luis Guillermo Llorente Peters, por todo su apoyo, enseñanzas y por permitirme continuar el Doctorado bajo su tutela. Gracias por todo.

A la Dra. Selva Lucía Rivas Arancibia por su apoyo, sus enseñanzas y consejos brindados.

Al Dr. Alejandro Zentella Dehesa por todo el apoyo brindado y a sus comentarios acertados, que me permitieron llevar a buen término la tesis.

A mis maestros:

A todos mis maestros que me han inspirado para seguir este camino.

Al Dr. Javier Cabiedes Contreras[†] por todas sus enseñanzas, apoyo y amistad. Siempre vivirá en mis pensamientos.

Al Dr. Antonio Cabral Castañeda, por su apoyo incondicional, por sus enseñanzas y amistad.

A mi familia y amigos:

A mi familia, principalmente a mi Madre quien ha hecho todo lo posible para que yo cumpliera mis sueños. Te amo Mamá.

A Diego por su apoyo incondicional en todo momento, por sus consejos y su cariño. Te amo.

A mis compañeros y amigos del Departamento del INCMNSZ, es especial a Araceli, Martha, Tere, José Luis y Carlos por todo su apoyo y amistad.

A Patricia González por ser una gran compañera y amiga, te agradezco toda tu ayuda.

Al Dr. Octavio Velázquez de la Torre por su amistad, confianza y apoyo incondicional durante todo este tiempo.

Índice

Página

	Índice de figuras.....	i
	Índice de tablas.....	ii
	Índice de abreviaturas.....	iii
	Resumen.....	1
	Abstract.....	3
1.	Introducción.....	5
1.1	Antecedentes históricos.....	5
1.2	Características clínicas de la artritis reumatoide (AR)	7
1.3	Epidemiología de la AR.....	10
1.4	Diagnóstico de la AR.....	10
1.5	Genética y factores ambientales en AR.....	12
1.6	Citrulinación.....	14
1.6.1	Peptidil arginina deiminasa (PAD).....	16
1.6.2	Papel fisiológico de la citrulinación.....	17
1.6.3	Papel de la citrulinación en infecciones.....	18
1.6.4	Papel patogénico de la citrulinación en AR.....	21
1.6.5	Anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (APC) en AR	22
1.6.6	Detección de anticuerpos APC y su utilidad en el diagnóstico de pacientes con AR	23
1.6.7	Expresión de PAD en AR.....	24
1.7	Proceso inmunológico sinovial e inflamación en AR	25
2.	Justificación.....	29

3.	Hipótesis.....	30
4.	Objetivos.....	31
5.	Metodología.....	32
5.1	Pacientes.....	32
5.2	Obtención de homogenizados de muestras de tejido sinovial	32
5.3	Cultivos celulares.....	33
5.4	Purificación de RNA, RT-PCR y PCR.....	33
5.5	Citrulinación <i>in vitro</i>	35
5.6	Detección de anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (APC)	35
5.7	Análisis estadístico.....	36
6.	Resultados.....	37
6.1	La cantidad de proteínas citrulinadas está relacionada con la concentración de anticuerpos APC en el suero de pacientes con AR	37
6.2	Expresión de RNAm de <i>PADI2</i> y <i>PADI4</i> en tejido sinovial de pacientes con AR y OA	38
6.3	Expresión del RNAm de <i>PADI3</i> en tejido sinovial de pacientes con AR	39
6.4	Expresión del RNAm de <i>PADI2</i> , <i>PADI3</i> y <i>PADI4</i> en sinoviocitos tipo fibroblastos de pacientes con AR	42
7.	Discusión.....	44
8.	Conclusiones.....	48
9.	Literatura citada.....	49
10.	Apéndice.....	57

Índice de Figuras		Página
Figura 1	“El pintor y su familia”.....	5
Figura 2	Alfred Barred Carrod (1819-1907) “Padre de la Reumatología)	7
Figura 3	Mecanismo de reacción de la citrulinación.....	15
Figura 4	Papel de la citrulinación en procesos fisiológicos y patológicos	20
Figura 5	Proceso inmune adaptativo e innato en la articulación de AR	28
Figura 6	Diferente perfil de proteínas citrulinadas en muestras de tejido sinovial de pacientes con AR	38
Figura 7	Relación entre la cantidad de proteínas citrulinadas y la concentración de anticuerpos aPCC	39
Figura 8	Expresión relativa del RNAm de <i>PADI2</i> y <i>PADI4</i> en tejido sinovial de pacientes con AR	40
Figura 9	Expresión del RNAm de <i>PADI3</i> en tejido sinovial de pacientes con AR	42
Figura 10	Expresión del RNAm de <i>PADI2</i> y <i>PADI4</i> en sinoviocitos tipo fibroblastos de pacientes con AR	43

Índice de tablas		Página
Tabla 1	Características clínicas de la AR.....	8
Tabla 2	Manifestaciones extra articulares de la AR.....	9
Tabla 3	Factores pronóstico de severidad de AR.....	9
Tabla 4	Criterios de clasificación, Colegio americano de Reumatología 2010	11
Tabla 5	Genes con polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados con AR y su papel en patogénesis	13

Índice de Abreviaturas

ACR= American Collage Rheumatology

AFP=anti-factor perinuclear

AINES= anti-inflamatorios no esteroideos

AKA= anti-queratina

Anti-CM= anti-citrulina modificada

APC= anti-proteínas citrulinadas

aPCC= anti-péptidos cíclicos citrulinados

AR= Artritis reumatoide

Colágena tipo I= CI

Colágena tipo II= CII

EM= Esclerosis múltiple

EMTC= enfermedad mixta de tejido conectivo

Fc= fracción cristalizable

FR= Factor Reumatoide

H3= Histona 3

LEG= Lupus Eritematoso Generalizado

MMPs= Metaloproteinasas

MPT= modificaciones postraduccionales

NETs= "Neutrophil extracellular traps"

OA= Osteoartrosis

P. gingivalis= *Porphyromonas gingivalis*

PAD= peptidil arginina deiminasa

PADI= genes que codifican PAD

PBM= proteína básica de mielina

SE= epitopo compartido, "Shared epitope"

SNC= sistema nervioso central

SNP= polimorfismo de un solo nucleótido

SSp= Síndrome de Sjögren primario

Th1= Células T cooperadoras tipo 1

Resumen

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune de etiología multifactorial, se caracteriza por inflamación crónica de las articulaciones y la presencia de anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (APC). La citrulinación es catalizada por la familia de la enzima peptidil arginina deiminasa (PAD), de la cual se han descrito cinco isoformas; (PAD1, -2, -3, -4, y -6) con expresión diferencial en tejidos y órganos. Aunque la PAD2 y PAD4 son las isoformas relacionadas con la generación de antígenos citrulinados en AR, recientemente se ha descrito un subgrupo de pacientes con AR y enfermedad pulmonar intersticial asociado con anticuerpos anti-PAD3. Sin embargo aún no es claro si dichos anticuerpos son específicamente contra PAD3 o si corresponden a anticuerpos anti-PAD4 con reactividad cruzada, ya que la expresión de la PAD3 en la sinovia de AR aún no ha sido documentada. Entre las células que participan en el proceso inflamatorio en AR se sabe que los monocitos, macrófagos, neutrófilos, células B y células T expresan PAD2 y PAD4, sin embargo, se conoce poco sobre la expresión de dichas enzimas en los sinoviocitos tipo fibroblastos, los cuales participan en la proliferación sinovial observada en AR. Por otra parte, mientras la presencia de proteínas citrulinadas no es específica de la sinovia de AR, ya que han sido detectadas en otras artropatías, la presencia de APC sí es altamente específica de AR. Se ha reportado que existe una gran heterogeneidad entre las proteínas citrulinadas en el tejido sinovial de pacientes con AR, y son varios los estudios que han demostrado que las proteínas citrulinadas juegan un papel importante en la patogénesis de AR. Sin embargo, se desconoce si existe relación entre la cantidad de proteínas citrulinadas en el tejido sinovial de AR y anticuerpos APC circulantes. El objetivo de este estudio fue determinar la relación entre las proteínas citrulinadas en el tejido sinovial de

pacientes con AR con la concentración de anticuerpos APC circulantes y la expresión del RNAm de *PADI2*, *PADI3*, *PADI4* en el tejido sinovial y sinoviocitos tipo fibroblastos de pacientes con AR. Se analizaron 11 muestras de tejido sinovial de pacientes con AR y 12 de osteoartritis (OA), las cuales se obtuvieron durante cirugía de reemplazo de rodilla. Se detectaron proteínas citrulinadas en homogenizados de tejido sinovial por electroinmunotransferencia y anticuerpos APC por medio de un ELISA comercial anti-péptidos cíclicos citrulinados (aPCC), se midió por RT-PCR la expresión de *PADI2*, *PADI3* y *PADI4* en tejido sinovial y en cultivos de sinoviocitos tipo fibroblastos. Los pacientes con alta cantidad de proteínas citrulinadas en el tejido sinovial (3 de 7) tuvieron alta concentración de anticuerpos aPCC en suero. En contraste, en los cuatro pacientes restantes con AR, la cantidad de proteínas citrulinadas sinoviales fue mínima y la concentración de anticuerpos aPCC en suero fue baja. Además, se observó un incremento del RNAm de *PADI2* en el tejido sinovial de AR comparado con OA ($p=0.02$). Se detectó el RNAm de *PADI3* en el tejido sinovial de pacientes con AR, pero no en pacientes con OA. Aunque los sinoviocitos tipo fibroblastos no son la principal fuente de PAD en tejido sinovial de AR, se detectó que expresan moderadamente RNAm de *PADI2* y débilmente *PADI4* y no se detectó expresión de *PADI3*. En conclusión, se detectó una variedad de proteínas citrulinadas en el tejido sinovial de pacientes con AR y la cantidad de dichas proteínas se relacionó con la concentración de anticuerpos aPCC. Se detectó la presencia de *PADI3* en tejido sinovial y de *PADI2* y *PADI4* en sinoviocitos tipo fibroblastos de pacientes con AR.

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease of multifactorial etiology characterized by chronic inflammation of the joints and the presence of anti-citrullinated protein autoantibodies (ACPA). In humans, citrullination is catalyzed by the enzyme peptidylarginine deiminase (PAD), which may exist in five isoforms (PAD1, PAD2, PAD3, PAD4, and PAD6) with differential expression in tissues and organs. Although PAD2 and PAD4 are considered the most important isoforms in the family of RA-related PADs, a recent study described a subgroup of patients with RA and interstitial pulmonary disease with anti-PAD3. It is not yet clear, however, whether these antibodies are specifically against PAD3 or whether they correspond to antibodies with crossed reactivity against PAD4. It is known that inflammatory cells such as monocytes, macrophages, neutrophils, T cells and B cells express PAD2 and PAD4; however, little is known regarding the production of these enzymes by normal or RA fibroblast-like synoviocytes, cells that actively participate in the characteristic synovial proliferation observed in RA patients. On the other hand, while the presence of citrullinated proteins is not unique to the inflamed synovium of RA, for they have been detected in other arthropathies, the presence of ACPA is highly specific for RA. A great heterogeneity of citrullinated proteins in the synovial tissue of RA patients has been reported, and there are several studies that support the idea that these proteins play an important role in its pathogenesis. However, it is unknown whether there is a relationship between the amount of citrullinated proteins in RA synovia and circulating ACPA titers. The objective of this study was to determine the relationship between citrullinated proteins in synovial tissue with peripheral anti-citrullinated peptides autoantibodies (ACPA) and peptidylarginine

deiminase (*PADI*) *PADI2*, *PADI3*, and *PADI4* messenger RNA (mRNA) expressions in synovial tissue and fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis (RA) patients. Eleven RA and 12 osteoarthritis (OA) patients who underwent knee replacement surgery were studied. We detected citrullinated proteins in synovial tissue homogenates by western blot and serum ACPA by ELISA to anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibodies, and *PADI2*, *PADI3*, and *PADI4* mRNA expressions in synovial tissue and in fibroblast-like synoviocytes. Patients with high amount of citrullinated proteins in synovial tissue (3 out of 7) have high levels of anti-CCP in serum. However, in the remaining 4 patients, the amount of synovial citrullinated proteins was minimal and their sera showed low levels of anti-CCP antibodies. Furthermore, we observed an increase in *PADI2* mRNA expression in RA synovial tissue compared with OA patients ($p = 0.02$). We detected *PADI3* mRNA in the synovial tissue of RA patients, but not in the tissue of OA patients. Even though fibroblast-type synoviocytes in RA are not the main source of PADs in the synovial tissue, they express *PADI2* mRNA moderately; *PADI4* mRNA weakly, while there is no detectable expression of *PADI3* mRNA. In conclusion, we found a variety of citrullinated proteins in the synovial tissue of RA patients and the amount of such proteins is related to serum concentration of anti-CCP antibodies. We identified the presence of *PADI3* mRNA expression in synovial tissue and *PADI2* and *PADI4* mRNA expressions in fibroblast-like synoviocytes from patients with RA.

1. Introducción

1.1 Antecedentes históricos

Diversos estudios han demostrado la presencia de individuos con características similares a la artritis reumatoide (AR) que datan de 6500 a 4300 años a. C, en poblaciones indígenas en la región del *Green River*, oeste de Kentucky, y en la rama occidental del río Tennessee, en el noreste de Alabama y Tennessee. Bruce Rothschild y cols. informaron sobre los hallazgos de seis esqueletos con una patología erosiva y simétrica que comprometía manos, pies, rodillas, tobillos y hombros, apófisis odontoide y respetaba las articulaciones sacroilíacas, los cuerpos vertebrales y las articulaciones interfalángicas distales, por lo que descartan la posibilidad de una espondiloartropatía seronegativa, artritis psoriásica, gota, condrocalcinosis y osteoartritis, y concluyen que estos hallazgos encontrados, eran compatibles con artritis reumatoide y que del nuevo mundo se diseminó después de 1492 con el descubrimiento de América y antes de 1785, a través de algunos patógenos o vectores a Europa [1].



Figura 1. “El pintor y su familia” de Jacob Jordaens (1593-1678). Las manos de la dama sugieren AR.

En 1857 Dublín y Regius, fueron los primeros en definir a la enfermedad en su *Atlas Illustrations of the effects of rheumatic gout or chronic rheumatic arthritis*, así como también los conceptos de cronicidad y simetría. En este texto utilizaron el término de artritis reumática y se ilustraron por segunda vez pinturas de las manos de pacientes con AR, ya que la primera ilustración, la realizó el patólogo francés Cruveilhier (Figura 1). Por su parte, Garrod cambió el sufijo “ica” por “oide” en 1859 (Figura 2), denominación que la *American Rheumatism Association* aceptó hasta 1942 el cual sigue vigente hasta nuestros días. [2]

Una de las observaciones más relevantes del siglo pasado con respecto a la AR, fue la descripción de Waaler en 1937, quien mostró que los eritrocitos de carnero recubiertos con anticuerpos eran aglutinados por el suero de los pacientes con AR. En 1949 Coggeshall propuso el término de Factor Reumatoide (FR) para definir el fenómeno descrito. Posteriormente el FR fue identificado como un autoanticuerpo. A mediados de los años 50 el FR fue caracterizado como una molécula de inmunoglobulina de isotipo IgM dirigida contra la fracción cristalizable (Fc) de la molécula IgG. En la actualidad a esta molécula se le conoce como FR clásico [3,4].



Figura 2. Alfred Baring Carrod (1819-1907) el “padre de la Reumatología”, fue el primero en acuñar el termino artritis reumatoide en 1857.

1.2 Características clínicas de la AR

La AR es la artritis inflamatoria más frecuente de las enfermedades crónicas autoinmunes sistémicas. Aunque puede afectar diversos órganos, la AR se caracteriza por la inflamación de la membrana sinovial de la articulaciones de manera simétrica. En el tejido sinovial afectado se produce destrucción local que invade y daña las estructuras de la articulación, lo que provoca pérdida de la función y da lugar a la discapacidad en los pacientes con AR.

Es una enfermedad altamente heterogénea cuyos síntomas predominantes son dolor, rigidez e inflamación de las articulaciones periféricas (Tabla 1) [5].

Tabla. 1 Características clínicas de la AR

Síntomas

- Inflamación de articulaciones
- Dolor/rigidez
- Debilidad
- Deformidad
- Cansancio/Malestar general
- Fiebre
- Pérdida de peso
- Depresión

Características articulares

- Blandas al tacto
- Engrosamiento sinovial
- Efusión (al principio)
- Eritema (al principio)
- Dificultad de movimientos
- Anquilosis
- Subluxación

Distribución

- Simetría
- Distal, más común que proximal
- PIF, MCF/MTP, muñeca/tobillo más comúnmente que codo/rodilla, hombro/ cadera

PIF= articulación proximal interfalángica. MCF= articulación metacarpo falángica. MTP= articulación metatarso falángica.

En algunos pacientes la historia natural de la enfermedad se presenta como una inflamación crónica de grado leve auto limitante, sin embargo, también puede manifestarse como inflamación generalizada de progresión rápida. Aunque la AR se caracteriza por la afección de las articulaciones, pueden presentarse otras manifestaciones extra-articulares (Tabla 2) [5].

Tabla 2. Manifestaciones extra-articulares de la AR

Tipo	Prevalencia
Nódulos	11.8
Síndrome de Sicca	3.7
Síndrome de Sjögren	3.5
Fenómeno de Raynaud	0.6
Enfermedad pulmonar intersticial	2.2
Serositis (pleuritis y pericarditis)	2.1
Vasculitis (cutánea y generalizada)	1.8
Neuropatía periférica	0.8
Escleritis y episcleritis	0.4
Síndrome de Felty	0.3
Amiloidosis secundaria	0.3
Glomerulonefritis	0.2

Se han identificado ciertos factores de pronóstico negativo para AR (Tabla 3), a través del curso clínico, de pruebas de laboratorio y de análisis radiológico. Sin embargo, ninguno es lo suficientemente confiable para permitir una decisión terapéutica personalizada [5]

Tabla 3. Factores pronósticos de severidad en AR

-
- Presencia de autoanticuerpos (FR y anti-CCP)
 - Presencia de los alelos del epitope compartido
 - Desarrollo temprano de erosiones articulares
 - Número elevado de articulaciones afectadas
 - Incapacidad temprana
 - Edad de comienzo avanzada
 - Presencia de manifestaciones extra-articulares
-

1.3 Epidemiología de la AR

La AR, como la mayoría de las enfermedades autoinmunes, se presenta con mayor frecuencia en mujeres que en hombres, en una proporción 3:1. Puede presentarse a cualquier edad pero es más habitual entre 40 y 60 años de edad. La enfermedad afecta al 1% de la población global. Sin embargo, su prevalencia varía según el país y el área geográfica. En países del sur de Europa existen niveles medios de incidencia menores que los países del norte de Europa y América. Los países en vías de desarrollo tienen una incidencia aún menor, siendo la prevalencia notablemente baja en las zonas rurales de África. En contraste, es más frecuente en poblaciones nativas americanas. En México, 16 de cada 1000 adultos (1.6%) padecen AR [6,7].

1.4 Diagnóstico de la AR

Debido a que ninguno de los signos o síntomas de la AR son exclusivos de la enfermedad, su diagnóstico se realiza en base a los criterios definidos por el *American College of Rheumatology* (ACR, Colegio Americano de Reumatología) para la clasificación de AR [8]. Un índice ≥ 6 es requerido para la clasificación de un paciente con AR definida (Tabla 4).

Tabla 4. Criterios de clasificación para AR, Colegio Americano de Reumatología 2010

Población de interés (¿Quiénes podrían ser evaluados?): Pacientes que:

- 1) tienen al menos una articulación con sinovitis clínicamente definida con sinovitis que no pueda ser explicada por otra enfermedad
- 2) con sinovitis que no pueda ser explicada por otra enfermedad

Criterios de clasificación para AR (algoritmo basado en puntuación: suma de puntuación de las categorías A-D) una puntuación de $\geq 6/10$ es necesario para la clasificación de un paciente con AR definida

Articulación afectada

- | | | |
|----|---|---|
| A. | 1 articulación grande | 0 |
| | 2-10 articulaciones grandes | 1 |
| | 1-3 articulaciones pequeñas (con o sin daño en articulaciones grandes) | 2 |
| | 4-10 articulaciones pequeñas (con o sin daño en las articulaciones grandes) | 3 |
| | >10 articulaciones (al menos 1 articulación pequeña) | 5 |

Serología (es necesario al menos un resultado para la clasificación)

- | | | |
|----|--|---|
| B. | FR negativo y APC negativo | 0 |
| | FR positivo bajo o anticuerpos APC positivo alto | 2 |
| | FR positivo alto o anticuerpos APC positivo alto | 3 |

Reactantes de fase aguda (es necesario al menos 1 resultado para la clasificación)

- | | | |
|----|---------------------------|---|
| C. | Normal PCR y normal VSE | 0 |
| | Anormal PCR o anormal VSE | 1 |

Duración de los síntomas

- | | | |
|----|------------------|---|
| D. | < 6 semanas | 0 |
| | ≥ 6 semanas | 1 |

FR= Factor Reumatoide, APC= anti-proteínas citrulinadas, PCR= proteína C reactiva, VSE= velocidad de sedimentación eritrocitaria.

Dentro de los marcadores serológicos incluidos en los criterios de clasificación para AR se encuentran el FR y los anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (APC) [8]. En el caso del FR de isotipo IgM, diversos estudios han mostrado que tiene una sensibilidad de 66% y especificidad de 82% para AR, debido a que puede presentarse en otras patologías incluyendo infecciones crónicas o bien en otras enfermedades autoinmunes como Lupus eritematoso generalizado (LEG), enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC) y síndrome de Sjögren primario (SSp), a concentraciones incluso mayores que en AR. Además se ha encontrado

sobretudo que la población geriátrica y sujetos sanos pueden presentar FR positivo [9-11].

Por otro lado, los anticuerpos APC son una variedad de autoanticuerpos que reconocen diferentes proteínas citrulinadas y pueden estar presentes en suero años antes del inicio de la enfermedad [12]. La sensibilidad y especificidad de dichos autoanticuerpos para AR es de 80% y 90%, respectivamente [10]. Además de su alta especificidad para AR, los anticuerpos ACP han sido aceptados como parte de los mecanismos patogénicos de la AR [13].

1.5 Genética y factores ambientales en AR

Aunque la causa de la AR es desconocida, los estudios realizados en familias y en gemelos demuestran una base genética de la enfermedad. Existen varios genes asociados con AR, entre los más estudiados y caracterizados se encuentran los genes del HLA, particularmente los alelos *HLA-DRB1* los cuales contienen una región común en la cadena β de cinco aminoácidos (QKRAA), denominada epitopo compartido (SE, por sus siglas en inglés “*shared epitope*”), el cual permite la unión de péptidos específicos relacionados con la enfermedad [14]. Existen otros alelos de riesgo en pacientes con AR seropositivos para APC (Tabla 5) , entre ellos los asociados con la señalización de NF- κ B (*TRAF1-C5* y *cREL*) y los relacionados con la estimulación, activación y diferenciación de las células T (*PTPN22* y *CTLA4*) [14].

Tabla 5. Genes y polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) asociados con AR y su papel en la patogénesis

Gen y vía de señalización	Locus SNP	Función relevante
Activación de Células T		
<i>HLA-DRB1</i>	6p21	Alelo HLADRB1 (también conocido como epítopo compartido) involucrado en la presentación antigénica y responsable de la selección del repertorio de células T. Asociación genética con AR
<i>PTPN22</i>	1p13.2	Fosfatasa de tirosina involucrada en la regulación del umbral de activación de los linfocitos; asociación genética con AR
<i>AFF3</i>	2q11.2	Factor de transcripción en el desarrollo linfoide
<i>CD28</i>	2q33.2	Molécula coestimuladora de células T
<i>CD40</i>	20q13.12	Molécula coestimuladora que aumenta las interacciones entre células T y B e incrementa la producción de anticuerpos
<i>CTLA4</i>	2q33.2	Molécula supresora que regula las interacciones entre las células T y las células presentadoras de antígeno
<i>IL2RA</i>	10p15.1	Receptor de alta afinidad para IL-2
<i>IL2</i>	4q27	Citocina que regula la activación de las células T, particularmente las células T reguladoras
<i>IL-21</i>	4q27	Citocina que regula la diferenciación de las células T, particularmente las células Th17 y activación de las células B
<i>PRKQ</i>	10p15.1	Miembro de la familia de la proteína cinasa C que regula la activación de células T y macrófagos
<i>STAT4</i>	2q32.3	Traductor de la señalización de citocinas que regula la proliferación, supervivencia y diferenciación de linfocitos
Vía NF-κB		
<i>REL</i>	2p16.1	Proto-oncogen miembro de la familia NF-κB que regula la activación y supervivencia de los leucocitos
<i>TNFAIP3</i>	6q23.3	Proteína de señalización y regulador negativo de la activación inducida por NF-κB
<i>TRAF1</i>	9q33.1	Regulador de la señalización de la familia de receptores de TNF-α
Otras vías		
<i>BLK</i>	8p23.1	Cinasa de tirosina involucrada en la señalización del receptor de células B y su desarrollo
<i>CCL21</i>	9q13.3	Quimiocina implicada en la formación de centros germinales
<i>FCGR2A</i>	1q23.2	Receptor Fc de IgG de baja afinidad que regula la activación de macrófagos y neutrófilos y la eliminación de complejos inmunes
<i>PADI4</i>	1p36.2	Enzima que convierte arginina a citrulina, genera auto-antígenos en AR
<i>PRDM1</i>	6q21	Proteína que actúa como un represor de la expresión de IFN-β
<i>TNFRSF14</i>	1p36.32	Miembro de la familia del receptor TNF-α con actividad pro-inflamatoria

Por otra parte, el tabaquismo y otras formas de estrés bronquial (exposición a sílica) incrementan el riesgo de padecer AR en personas que expresan los alelos *HLA-DRB1* asociados con mayor susceptibilidad de padecer AR. Además, reuniendo los dos aspectos anteriores en pacientes con AR se aumenta la posibilidad de tener APC positivos [15].

1.6 Citrulinación

La citrulinación es una modificación post-traducciona catalizada por las enzimas peptidil arginina deiminasa (PAD). Las PAD son un grupo de enzimas dependientes de calcio que convierten a la arginina en citrulina. Debido al grado de citrulinación, puede cambiar la estructura primaria, secundaria o terciaria de las proteínas. La citrulinación de proteínas está involucrada en varios procesos fisiológicos como queratinización de la piel, regulación de genes y muerte celular por apoptosis y NETosis, además se ha identificado en procesos patológicos como neurodegeneración, autoinmunidad y cáncer (Figura 4).

Los estudios realizados *in vitro* con tiocohialina y filagrina muestran que la modificación del 5.0 % de los residuos de arginina provocan la destrucción de la estructura terciaria y modificaciones mayores al 10.0 % de los residuos de arginina causan la pérdida completa de la estructura, provocando la desnaturalización de las proteínas [16]. La conversión de arginina a citrulina en las proteínas es capaz de activar la respuesta inmune. Dicha conversión da como resultado un cambio en la carga del aminoácido. La arginina es un aminoácido fuertemente básico (punto isoeléctrico de 10.76) debido a la presencia del grupo guanidino que puede ser fácilmente protonado a pH fisiológico (7.2-7.4). La eliminación del grupo imino (transformación referida como citrulinación) es catalizada por la PAD (Figura 3). La

citrulina resultante carece de carácter básico [17], lo cual puede modificar las interacciones proteicas y promover la generación de neoepitopos.

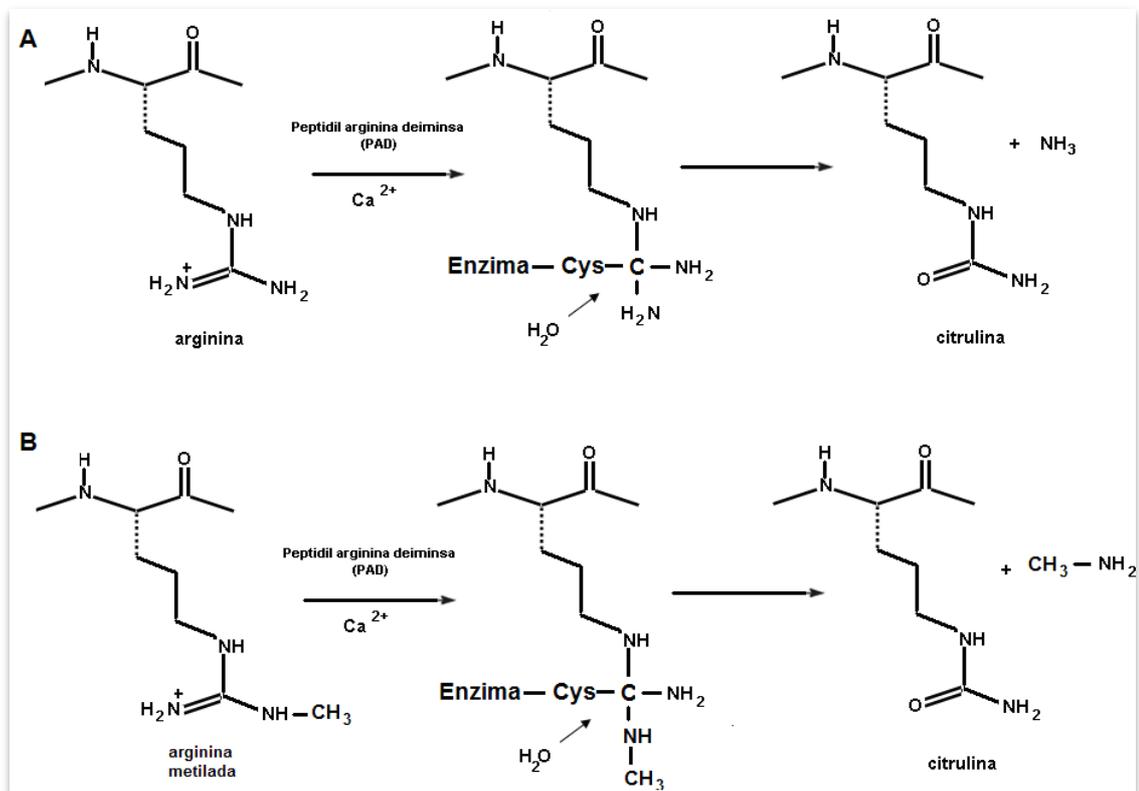


Figura 3. Mecanismo de reacción de la citrulinación. El proceso de citrulinación involucra la conversión enzimática de arginina a citrulina. Durante la reacción, la arginina es atacada por el residuo Cys del centro catalítico formando un aducto tetrahedral, después el aducto es cortado por el ataque nucleofílico de una molécula de agua que regenera el residuo Cys y forma el grupo ceto

1.6.1 Peptidil arginina deiminasa (PAD)

El proceso de citrulinación de proteínas es catalizado por una familia de enzimas dependientes de calcio, conocidas como PAD de las cuales se han descrito cinco isoformas en el humano. Sin embargo su organización genómica, localización subcelular y expresión en diferentes tejidos no se conoce totalmente.

Los genes que codifican para las PAD (*PADI*) están localizadas en el cromosoma 1p36.13; el tamaño de la región es de 300 Kb. Los *PADI- 1, 3, 4, 5 y 6* están cercanos en una región de 160 Kb. El *PADI2* se encuentra separado de los otros cuatro, es el más largo de esta familia de genes. Esta organización genómica se encuentra conservada entre las especies [18].

Las isoenzimas de las PAD están ampliamente distribuidas en los tejidos de mamíferos. La PAD1 se expresa en la epidermis y útero, la PAD2 es expresada en músculo, glándulas salivales y sistema nervioso central (SNC); la citrulinación por PAD2 ha sido implicada en la patogénesis de la esclerosis múltiple (EM) y el Alzheimer. La PAD3 se localizada en folículos pilosos, la PAD4 es expresada principalmente en células hematopoyéticas, participa en la regulación de genes y ha sido implicada en cáncer. La PAD2 y PAD4 se expresan junto con los anticuerpos APC en la sinovia de pacientes con AR. La PAD6 se expresa en ovarios y testículos. Además de las células eucariontes, la PAD es expresada en *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*). Recientemente, se ha propuesto una posible conexión entre infección periodontal por *P. gingivalis* y AR [19-21].

1.6.2 Papel fisiológico de la citrulinación

Piel: La citrulinación de la filagrina permite la agregación de la queratina, a través de la generación de interacciones intermoleculares *de novo*, lo cual es importante durante la diferenciación terminal de la epidermis. Por otro lado, los anticuerpos APC específicos de pacientes con AR pueden tener reactividad cruzada contra la filagrina citrulinada, aunque la filagrina no sea el blanco antigénico expresado en la membrana sinovial. Los principales blancos de los anticuerpos anti-filagrina citrulinada purificados de pacientes con AR son las cadenas α y β de la fibrina y colágena depositadas en la membrana sinovial [22].

Sistema nervioso central (SNC): La PAD2 es expresada abundantemente en el SNC, principalmente por oligodendrocitos, astrocitos y células de la microglia. La citrulinación de la proteína básica de mielina (PBM) y la proteína ácida fibrilar de la glía es esencial para la plasticidad del CNS en edad temprana. La mielina es el material liposoluble que rodea los axones en forma de varias láminas compactadas, su papel principal es facilitar la conducción rápida de impulsos nerviosos. Uno de los principales componentes del SNC la PBM, la cual se une a lípidos de carga negativa sobre la membrana de los oligodendrocitos y es la responsable de la adhesión de las multilaminillas de las vainas de mielina. Durante el desarrollo del SNC las modificaciones postraduccionales (MPT) de la PBM son un fenómeno normal, sin embargo, pueden incrementarse durante la degeneración de la mielina en pacientes con EM, afectando las interacciones de las vainas de mielina con otras moléculas. En particular, el grado de citrulinación de la PBM se correlaciona con la gravedad de la EM, e indica un defecto temprano que precede la neurodegeneración [23].

Regulación de genes: La epigenética es el conjunto de procesos químicos que modifican la actividad del DNA sin alterar su secuencia, un ejemplo de ello son las MPT de las histonas, las cuales pueden ser catalizadas por diferentes enzimas tales como, histona acetiltransferasa, histona deacetilasa, histona metil-transferasa y PAD4. La PAD4, es la única de las PAD que puede translocar al núcleo. En el núcleo, la PAD4 citrulina los residuos de monometil-arginina de la histona 3 (H3) y H4 lo cual puede regular negativamente la expresión de genes [24].

Por otro lado, las mutaciones en el gen *p53* son las alteraciones más comúnmente observadas en los diferentes tipos de cáncer. Aunque se considera que la función crucial de *p53* es como factor de transcripción, y que su activación da como resultado el arresto del ciclo celular o apoptosis, se ha sugerido que el *p53* podría modular las propiedades biológicas de ciertas proteínas a través de la inducción de las MPT. La citrulinación es una de las MPT que se induce cuando existe daño del DNA; se ha observado que existe una regulación dependiente de *p53/PAD4*. El silenciamiento de *p53* o *PAD4* inhibe la citrulinación, lo anterior es debido a que la expresión de *PAD4* puede ser regulada a través de un sitio de unión de *p53* ubicado en el promotor del gen de *PAD4* [25].

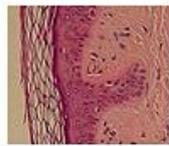
1.6.3 Papel de la citrulinación en infecciones

En respuesta a infección por bacterias, los polimorfonucleares forman estructuras de cromatina altamente decondensadas denominadas NET por sus siglas en inglés “*neutrophil extracellular traps*”, y que fueron descritos inicialmente en neutrófilos [26]. Los NET funcionan como una barrera de contención y eliminación de microorganismos. Uno de los componentes principales en la formación de los NET es la activación de la *PAD4* (Figura 4). En los neutrófilos la *PAD4* se expresa

abundantemente dentro de los gránulos citoplásmicos, sin embargo puede translocar al núcleo y regular la expresión de genes o inducir la generación de NET [27]

La activación de PAD4 en neutrófilos es altamente sensible a estímulos inflamatorios tales como el péptido Met-Leu-Phe formilado (f-MLP), ácido lipoteicoico (LTA) o TNF. En contraste la inducción de la apoptosis en neutrófilos bloquea la activación de la PAD4. Los neutrófilos senescentes que no fueron requeridos para combatir la infección mueren por apoptosis. En cambio, los neutrófilos en contacto con microorganismos en el curso de una infección desarrollan una forma elaborada de suicidio celular. Estos neutrófilos mueren por expulsión de cromatina nuclear con la finalidad de capturar o “atrapar” microorganismos patógenos [27,28].

Epidermis



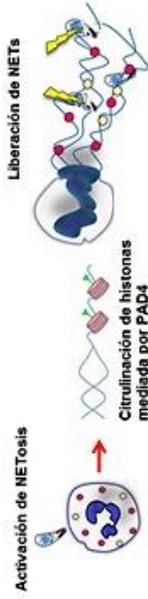
Queratinización
Queratina
Tricohialina
Filagrina

Regulación de genes



Sitios de unión para receptor de estrógeno, AP1 y p53

Sistema inmune



Artritis Reumatoide

Genética

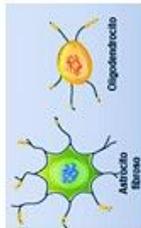
HLA-DRB1
PTPN22

Medio ambiente



Tabaquismo
Infección *P. gingivalis*

Sistema nervioso

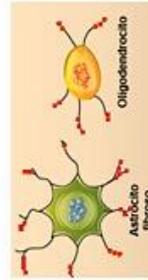


Estabilidad de las vainas de mielina
Plasticidad del cerebro

Psoriasis



Esclerosis múltiple



Hipocitrulinación de K1

Hipercitrulinación de PBM

Citrulinación

Carcinogénesis



↑ Citrulinación en el tejido
↑ Expresión de PAD4 tejido y periferia
PAD4 interfiere con la vía de p53
La citrulinación altera la actividad de antitrombina y citokeratina



Generación de proteínas citrulinadas y anticuerpos anti-proteínas citrulinadas
Pérdida de Tolerancia



Manifestación de la AR

Figura 4. Papel de la Citrulinación en procesos fisiológicos y patológicos. Durante la queratinización varias proteínas son citrulinadas, lo cual permite contribuir con la estabilidad de la matriz en la piel. La citrulinación de la PBM es importante para la correcta función de las vainas de mielina. La PAD4 está relacionada con la regulación de genes; contiene sitios de unión para receptor de estrógeno (RE), AP-1 y p53. Recíprocamente PAD4 influye en la expresión de los genes de estrógeno y p53. La citrulinación participa en la formación de NETs. En psoriasis existe una disminución de la citrulinación, por el contrario en esclerosis múltiple existe hipercitrulinación. En pacientes con cáncer hay incremento de la expresión de PAD4 y citrulinación en tejidos afectados. La hipótesis es que PAD4 interfiere con la vía p53, y por su parte la citrulinación altera la actividad antitrombina y citoqueratina, lo cual contribuye a la función anormal de las células. La interacción de la genética y el medio ambiente juegan un papel importante en la patogénesis de AR seropositiva para anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (APC). La citrulinación no específica por tabaquismo o por infección favorece la producción de proteínas citrulinadas en individuos que portan el HLA-DRB1 SE o el polimorfismo de PTPN22 asociado a AR. El rompimiento de la tolerancia en estos individuos induce la producción de anticuerpos APC y la activación de células T autoreactivas dando lugar a un proceso crónico autoinmune.

1.6.4 Papel patogénico de la citrulinación en AR

Existen diversos trabajos que muestran el papel patogénico de las proteínas citrulinadas en AR; en un modelo de artritis en rata (Lew.1AV) se demostró que la citrulinación de la colágena inoculada es un potente mecanismo para incrementar su autorreactividad así como inducir un incremento en la concentración de anticuerpos APC. Además, se observó que la severidad de la AR se correlacionó con la expresión de la PAD4, una isoforma de la enzima que cataliza la citrulinación, en infiltrados mononucleares y con la cantidad de colágena citrulinada [13]. Por otra parte, se ha demostrado que en los ratones transgénicos para la molécula HLA-DRB1*0441, inmunizados con fibrinógeno citrulinado humano, desarrollan artritis progresiva con presencia de APC [29].

1.6.5 Anticuerpos anti-proteínas citrulinadas (APC) en AR

Los primeros anticuerpos APC descritos fueron los anticuerpos anti-factor perinuclear (AFP), reportados por Nienhuis y Mandema en 1964 en pacientes con AR [30]. En 1979, Young demostró que los sueros de pacientes con AR reaccionaban con el epitelio de esófago de rata y definió a éstos anticuerpos como anticuerpos anti-queratina (AKA) [31]. Ambos anticuerpos AFP y AKA, detectados mediante inmunofluorescencia indirecta, mostraron alta especificidad para AR (90-98%). Sin embargo, debido a su sensibilidad limitada (40-45%) y a la falta de estandarización de las técnicas utilizadas para su detección, el estudio de los anticuerpos AFP y AKA fue limitado. En 1995 Sebbag y cols., mostraron que tanto los AFP como los AKA reconocían moléculas relacionadas con la filagrina [32]. Posteriormente, en los estudios en los que se utilizó filagrina recombinante o fragmentos de péptidos sintéticos, los sueros de pacientes con AR mostraban poca o nula reactividad [33], lo cual sugería que la inmunogenicidad de la filagrina podría estar relacionada con MPTs. Girbal-Neuhaser demostró que el antígeno reconocido por los anticuerpos AFP y AKA se trataba de profilagrina citrulinada [33]. Dado que la filagrina o profilagrina no se expresan en las articulaciones, no fue posible considerar a la filagrina como el autoantígeno específico de la articulación que dirige la respuesta contra el factor perinuclear y la queratina [34]. Debido a la importancia de la detección de los anticuerpos APC, diversos estudios han demostrado la presencia de antígenos citrulinados inmunodominantes tales como: fibrinógeno [34] colágena tipo I y II (CI yCII) [35,36], vimentina [37,38], fibronectina [39], y enolasa alfa [40].

1.6.6 Detección de APC y su utilidad en el diagnóstico de la AR

Existe una gran variedad de anticuerpos APC en pacientes con AR, sin embargo no todos tienen utilidad en el diagnóstico. Por ejemplo, los anticuerpos anti-colágena tipo II (anti-CII) los cuales se encuentran comúnmente en los pacientes con AR carecen de utilidad para el diagnóstico de AR [41]. En contraste, existen otros anticuerpos APC que tienen utilidad como predictores de ciertas manifestaciones clínicas, tal es el caso de los anticuerpos anti-fibrinógeno citrulinado, los cuales están relacionados con mayor progresión radiológica [42]; los anticuerpos anti-enolasa alpha citrulinada se encuentran en etapas tempranas de la AR, además tienen un valor potencial en el diagnóstico y pronóstico [43]; los anticuerpos anti-vimentina citrulinada se encuentran relacionados con manifestaciones extra articulares y con la actividad de la enfermedad [44,45].

De los anticuerpos APC mencionados anteriormente, solo los anticuerpos anti-vimentina citrulinada son detectados de manera rutinaria. En los demás casos son determinados por motivos de investigación. Inicialmente, la detección de los anticuerpos APC se realizaba mediante una prueba que utilizaba como antígeno citrulinado péptidos cíclicos derivados de la filagrina, [anticuerpos anti péptidos cíclicos citrulinados (aPCC)], lo cual incrementaba considerablemente la sensibilidad y especificidad de la prueba para AR (68 y 98 %, respectivamente) [46]. Actualmente, la detección de los anticuerpos aPCC es mediante el uso de pruebas que utilizan diferentes péptidos cíclicos citrulinados inmunodominantes de diversas proteínas con la finalidad de incrementar la sensibilidad y especificidad de la prueba.

Si bien la presencia de proteínas citrulinadas no es específica del tejido sinovial de pacientes con AR, ya que ha sido detectada en otras artropatías, la presencia de

anticuerpos APC es altamente específica de pacientes con AR [47]. No obstante, existe un subtipo de pacientes con AR seronegativos para anticuerpos aPCC y alrededor del 10% de ellos tienen anticuerpos que reconocen otras proteínas citrulinadas pero que carecen de utilidad como biomarcadores de AR [48].

1.6.7 Expresión de PAD en AR

Otro elemento importante en AR es la expresión de las enzimas que catalizan la citrulinación de las proteínas. Específicamente, se ha encontrado que ciertos SNP de PAD4 tienen asociación con AR en población asiática [49-51]. Por otra parte, los anticuerpos anti-PAD4 son altamente específicos de AR y se encuentran en el 30 % de estos pacientes [52-56]. Además, la expresión de PAD4 ha sido analizada en cortes de tejido sinovial de pacientes con AR y se ha localizado en sitios adyacentes a proteínas citrulinadas [57]. Recientemente se ha documentado que los pacientes con AR tienen anticuerpos con reactividad cruzada para PAD3 y PAD4 asociados con enfermedad pulmonar intersticial. Sin embargo, aún no existe información sobre la expresión de PAD3 en el tejido sinovial de pacientes con AR [58].

1.7 Proceso inmunológico sinovial e inflamación en AR

La sinovitis inicia cuando los leucocitos infiltran el compartimento sinovial. En principio la acumulación de leucocitos en la sinovia es debida a la migración más que la proliferación local. La migración celular es inducida por la activación endotelial en micro vesículas sinoviales, la cual incrementa la expresión de moléculas de adhesión (incluidas las integrinas, selectinas y quimiocinas) [59]. En consecuencia, la neo angiogénesis, inducida por condiciones de hipoxia, citocinas e insuficiente linfangiogénesis, limita el egreso celular, y es característica tanto de la sinovitis temprana como de la establecida [60]. Estos cambios microambientales, combinados con la reorganización y activación de los fibroblastos locales, permite la acumulación de tejido sinovial inflamado en AR.

Sistema inmune adaptativo

Aunque la AR era considerada convencionalmente una enfermedad mediada por células T cooperadoras tipo 1 (Th1), ha incrementado considerablemente la atención sobre el papel de las células Th17, un subtipo celular productora de IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 y TNF [61]. Otro subtipo importante, son las células B sinoviales, las cuales se localizan generalmente en agregados células B-células T. Dichas interacciones son favorecidas por la expresión de ciertas moléculas como el ligando de inducción de proliferación (APRIL), estimulador de linfocito B (BLyS), CXCL14 y CCL21 [62].

Sistema inmune innato

Una variedad de células efectoras residen en el tejido sinovial de la AR principalmente, macrófagos, mastocitos, células NK por sus siglas en inglés “*natural killer*”, en tanto, los neutrófilos residen principalmente en el líquido sinovial. Los macrófagos juegan un papel central en la sinovitis a través de la producción de citocinas como IL-1, IL-6, IL-12, IL-15 IL-18 e IL-23, de especies de oxígeno reactivas, intermediarios de nitrógeno, fagocitosis y presentación antigénica. Los neutrófilos contribuyen con la sinovitis a través de la producción de prostaglandinas, proteasas e intermediarios de especies reactivas de oxígeno [63].

Respuesta en el tejido mesenquimal

La sinovia normal contiene sinoviocitos tipo fibroblastos y macrófagos residentes. En AR, la membrana sinovial está agrandada, los sinoviocitos tipo fibroblastos adquieren un fenotipo semiautónomo caracterizado por la pérdida de inhibición por contacto, por incremento de expresión de citocinas y quimiocinas, moléculas de adhesión, y metaloproteinasas (MMP) relevantes en la enfermedad. Además, los sinoviocitos tipo fibroblastos contribuyen directamente a la destrucción local del cartílago y a la cronicidad de la inflamación sinovial por promover un micro medioambiente que favorece la sobrevida de células T y células B y la respuesta inmune adaptativa [65]. El mecanismo molecular que mantiene la hiperplasia sinovial en AR es desconocido. Una posibilidad es la resistencia a apoptosis, la cual es mediada por diferentes vías, incluyendo mutaciones en el gen supresor de tumores p53 [66], expresión de proteínas de estrés (heat-shock protein 70), las cuales favorecen su proliferación [67].

La hiperplasia de la sinovia es el principal factor que favorece la destrucción del cartílago en AR. La pérdida de los factores protectores normales de la sinovia (por ejemplo expresión disminuida de lubricina) [68] alteran las características de unión a proteínas sobre la superficie del cartílago, lo cual promueve la adhesión e invasión de sinoviocitos tipo fibroblastos.

Los sinoviocitos tipo fibroblastos producen MMP, particularmente MMP-1, 3, 8, 13, 14, y 16 que participan en el desensamble de la red de colágena tipo II, un proceso que altera el contenido de glicosaminoglicano y retención de agua que favorece la disfunción biomecánica [69].

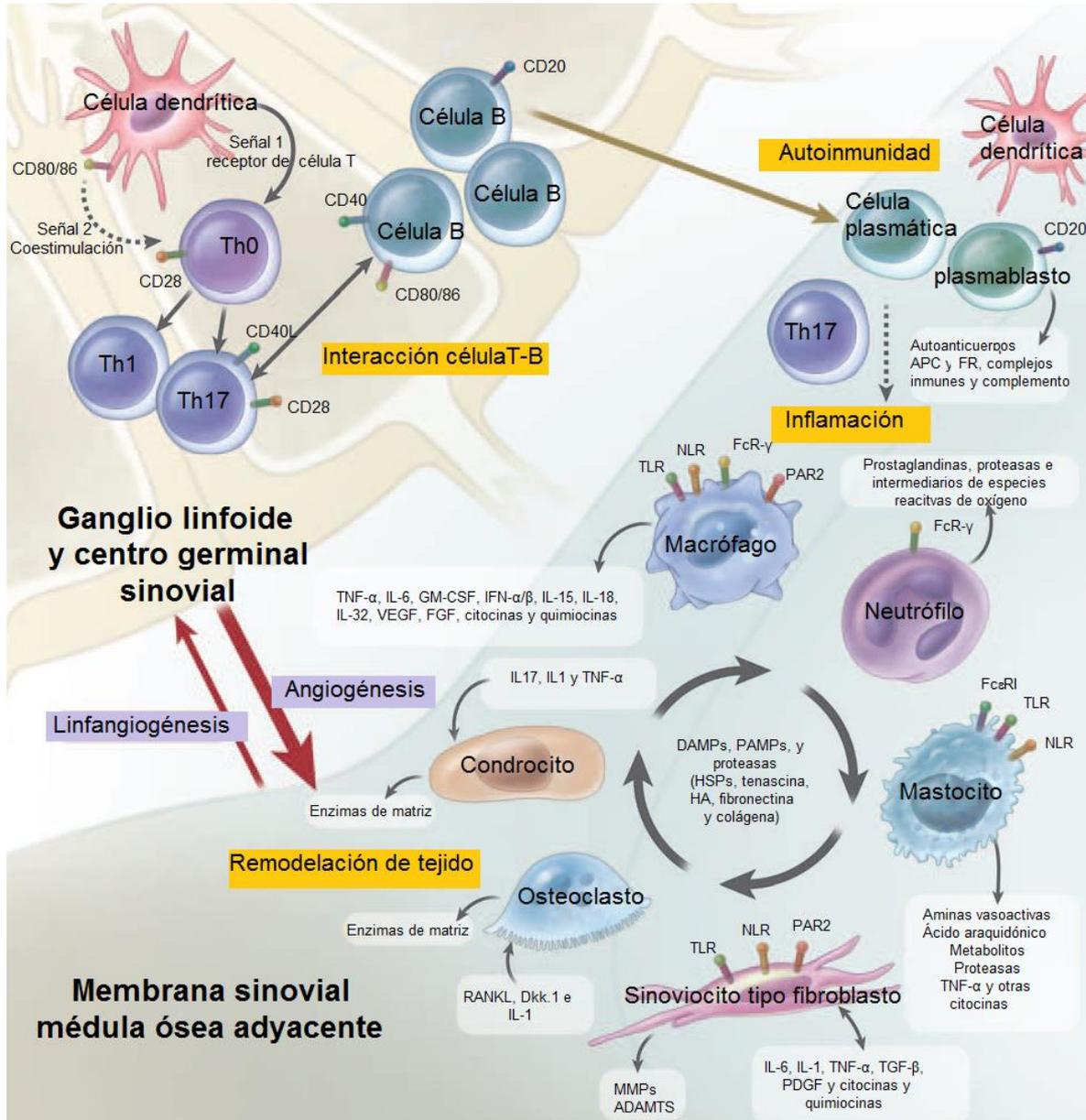


Figura 5 Proceso inmune adaptativo e innato en la articulación de AR. Las interacciones dependientes de coestimulación entre células dendríticas, células T y células B ocurren inicialmente en ganglios linfáticos; estos eventos generan una respuesta autoinmune hacia proteínas citrulinadas. En la membrana sinovial y médula ósea adyacente, la integración de las vías adaptativa e innata promueven tanto la remodelación como daño de tejido. La retroalimentación positiva del ciclo mediada por las interacciones de leucocitos, sinoviocitos tipo fibroblastos, condrocitos y osteoclastos, junto con los productos moleculares de daño, dirigen la fase crónica en la patogénesis de la AR. ADAMPs desintegrina y metaloproteína con dominios tipo trombospondina -1 ("desintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains"). DAMPs patrones moleculares asociados a daño ("damage associated molecular pattern"). PAMPs patrones moleculares asociados a patógenos ("pathogen associated molecular pattern"). HA ácido hialurónico "hialuronic acid". HSP proteínas de choque térmico ("Heat-shock-protein"). MMPs matriz metaloproteína. APC anti-proteínas citrulinadas. FR Factor reumatoide

2. Justificación

El papel de las proteínas citrulinadas es importante en la patogénesis de la AR, dichas proteínas contribuyen al mantenimiento de la respuesta autoinmune en esta enfermedad. Sin embargo, se desconoce si existe relación entre la cantidad de proteínas citrulinadas en el tejido sinovial y la concentración de anticuerpos APC en periferia en pacientes con AR. Es importante establecer lo anterior, ya que en el seguimiento de los pacientes podría ser de utilidad medir los anticuerpos APC y evaluar de manera indirecta si la cantidad de proteínas citrulinadas en el tejido sinovial se va modificando respecto al tiempo al tratamiento y tiempo de evolución.

De igual manera, el estudio de las enzimas responsables de la citrulinación es otro factor clave en la patogénesis de la AR, varios estudios han demostrado que anticuerpos de pacientes con AR presentan reactividad contra PAD3 y PAD4 asociado con enfermedad pulmonar intersticial, sin embargo aún no es clara la presencia de la isoforma PAD3 en la sinovia de AR. Por otra parte, los sinoviocitos tipo fibroblastos son un componente importante en la sinovitis de pacientes con AR. Aún se desconoce si los sinoviocitos tipo fibroblastos expresan alguna isoforma de PAD, ya que como ha sido planteado, la sinovia de AR comparte características con tejidos tumorales, entre ellas angiogénesis, depósito de fibrina, defectos en la proliferación celular, incremento en la coagulación, e incremento en la expresión de PAD4.

3. Hipótesis

Existe relación positiva entre la presencia de proteínas citrulinadas y anticuerpos aPCC en AR

Entre las células que expresan PAD3 se encuentran los neutrófilos los cuales juegan un papel importante en la sinovitis de AR, entonces *PADI3* se expresa en tejido sinovial de pacientes con AR.

El fenotipo de los sinoviocitos tipo fibroblastos comparte características con células tumorales luego, tendrían que expresar PAD.

4. Objetivos

Generales

- Analizar en AR la relación entre proteínas citrulinadas en tejido sinovial y la concentración de anticuerpos aPCC y la expresión de *PADI2*, *PADI3* y *PADI4* en tejido sinovial y en cultivos de sinoviocitos tipo fibroblastos de pacientes con AR

Particulares

- Detectar la presencia de proteínas citrulinadas en tejido sinovial de pacientes con AR
- Medir la concentración de anticuerpos aPCC en suero de pacientes con AR
- Medir la expresión de *PADI2*, *PADI3* y *PADI4* en tejido sinovial de pacientes con AR
- Medir la expresión de *PADI2*, *PADI3* y *PADI4* en cultivos de sinoviocitos tipo fibroblastos de pacientes con AR

5. Metodología

5.1 Pacientes

Se obtuvieron 11 muestras de tejido sinovial de pacientes con AR (mujeres) que cumplían con los criterios del Colegio Americano de Reumatología de 2010 [8], con edad promedio de 53 años (rango: 45-68 años), tiempo de evolución de 22 años (rango: 5-33 años), 63% recibía como tratamiento methotrexate, 45% prednisona, 36% hidroxicloroquina, 27% sulfazalazina y 27% leflunomida. Todos los pacientes con AR fueron positivos para anticuerpos aPCC, la concentración promedio fue 174 U/ml (rango: 46.4-366 U/ml). Al momento de la cirugía el 90% se encontraba en remisión de la enfermedad. Además, se obtuvieron 12 muestras de tejido sinovial de pacientes con OA (10 mujeres), con edad promedio de 77 años (rango: 68-88 años) y tiempo de evolución de 15 años (rango: 3-27 años). Todos los pacientes recibían AINES y tenían anticuerpos aPCC negativos: 4.8 U/ml (rango: 3.8-6.4 U/ml).

Las biopsias sinoviales se obtuvieron durante cirugía de reemplazo de rodilla. El estudio fue aprobado por el comité de ética institucional y todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito.

5.2 Obtención de homogenizados de muestras de tejido sinovial

Las muestras de tejido sinovial se fragmentaron y homogenizaron en amortiguador de lisis (HEPES 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, MgCl₂ 1.5 mM, DTT 1.0 mM, y PMSF 1.0 mM). Posteriormente, las muestras se congelaron y descongelaron tres veces y después se centrifugaron a 4°C por 10 minutos. Los sobrenadantes se colectaron, y se midió la concentración de proteínas por medio de ácido bicinonínico. Los sobrenadantes se almacenaron a -20° C hasta su uso.

5.3 Cultivos celulares

El tejido sinovial se fragmentó e incubó con solución de colagenasa tipo IV (0.025 g/10 ml) (SIGMA, St Louis, MO, USA). Se eliminaron los restos de tejido y el sobrenadante se centrifugó. El botón se resuspendió en medio Eagle Dulbecco modificado (GIBCO, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) con 10% de suero bovino fetal (GIBCO) y se transfirió a placa de cultivo. Después de cuatro pases (aproximadamente 80% de confluencia), se midió la expresión de CD90 [70] por citometría de flujo (BD Accuri C6 flow cytometer, Piscataway, NJ, USA) se utilizó un anticuerpo anti-CD90 (Thy.1) conjugado con FITC (eBiosciencie San Diego, CA, USA) como marcador de sionoviocitos.

5.4 Purificación de RNA, RT-PCR y PCR

Se aisló RNA total de tejido sinovial con el reactivo Trizol (GIBCO). El cDNA se obtuvo mediante RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad CA). Los genes de *PADI2*, *PADI3* y *PADI4* se amplificaron por PCR. Se normalizó con *GAPDH* o β -actina.

Los oligonucleótidos utilizados fueron:

Gen	Oligonucleótidos
<i>PADI2</i>	sentido 5' CTCCCCAGACCAGCATACTT 3' anti-sentido 5' AAGGACCAGGCAAGAGAAGAT 3'
<i>PADI3</i>	Sentido 5' GGTGAACTGTGACCGTGATG 3' Anti-sentido 5' GCTGGAGGTATGGAGGACAA 3'
<i>PADI4</i>	Sentido 5' TGGAACATG GTGCCCTGAG 3' Anti-sentido 5' GGGAGCCACAATATTCACAAGA 3'
<i>GAPDH</i>	Sentido 5' CATGTTCCAATATGATTCCAC 3' Anti-sentido 5' CCTGGAAGATGGTGATG 3'
<i>β actina</i>	Sentido 5' GGGTCAGAAGGATTCCTA 3' Anti-sentido 5' GGTCTCAAACATGATCTG 3'

Las condiciones de la PCR para *PADI2*, *PADI3*, *PADI4* y *β actina* fueron: 1 ciclo de 15 minutos a 50°C; 1 ciclo de dos minutos a 95°C; 35 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C. Para *GAPDH*: 1 ciclo de 15 minutos a 50°C; 1 de dos minutos a 95°C; 35 ciclos de 15 segundos, 30 segundos a 64°C y 30 segundos a 72°C.

5.5 Citrulinación *in vitro*

El lisado de células HEp-2 se citrulinó *in vitro* con PAD de músculo esquelético de rata (SIGMA). Se utilizó 0.5 U PAD/mg de lisado en amortiguador (Tris-HCl 0.1 M, CaCl₂ 10 mM, DTT 5 mM, pH 7.4), se incubó por 3 horas a 55°C. La reacción se detuvo adicionando EDTA 0.5 M para una concentración final de 20 mM.

5.5 Detección de proteínas citrulinadas

Las muestras se separaron por SDS-PAGE 10%, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, la detección de proteínas citrulinadas se realizó por medio de un equipo comercial anti-citrulina modificada (anti-CM) (Upstate Biotechnology, Temecula, CA). Brevemente, los residuos de citrulina de las proteínas inmovilizadas se modificaron con 2, 3 butanodiona monoxima y antipirina en una solución fuertemente ácida de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente los residuos de citrulina se detectaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-CM (Upstate Biotechnology) y un anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo conjugado con HRP (Upstate Biotechnology). Se utilizó un sustrato quimioluminiscente para HRP.

5.6 Detección de anticuerpos anti-proteínas citrulinadas

La concentración de anticuerpos anti-proteínas citrulinadas se determinó mediante un equipo comercial aPCC Quanta Lite CCP3 IgG ELISA (Innova Diagnostics Inc, San Diego, CA), el valor que se tomó de referencia fue 20 U/mL, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

5.7 Análisis estadístico

Se utilizó prueba de U de Mann-Whitney para determinar las diferencias entre grupos. El software que se utilizó para realizar el análisis fue Graph Pad versión 5.0 (GraphPad software, Inc, La Jolla, CA, USA). Se consideraron valores de p -menores de 0.05 como estadísticamente significativos.

6.Resultados

6.1 La cantidad de proteínas citrulinadas en tejido sinovial está relacionada con la concentración de anticuerpos anti-proteínas citrulinadas en el suero de pacientes con AR.

Se analizaron siete muestras de lisado de tejido sinovial de pacientes con AR (AR1-AR7) y 4 de pacientes con OA (OA1-OA4). En 3 de las siete (42%) muestras de tejido sinovial de pacientes con AR (AR1, AR2 y AR7) se detectó una gran cantidad de proteínas citrulinadas a diferencia de las 4 muestras restantes, en las cuales fueron indetectables (AR3, AR4-AR6). Por el contrario, en las muestras de pacientes con OA no se observó la presencia de proteínas citrulinadas, excepto en una muestra (OA1) en la que se detectó una banda de aproximadamente de 57 kDa con el anticuerpo anti-CM (Figura 6). Posteriormente, se midió la concentración de anticuerpos anti-PCC en suero de cada paciente. Se observó que los pacientes con AR con gran cantidad de proteínas citrulinadas en tejido sinovial, tuvieron una concentración alta en suero de anticuerpos anti-PCC (AR-II; 300 U/ml), en tanto que las muestras de tejido sinovial de pacientes con nula o poca cantidad de proteínas citrulinadas tuvieron una concentración menor de anticuerpos anti-PCC (AR-I; 40-70 U/ml) (Figura 7). Por otro lado, en el grupo de OA, todas las muestras fueron negativas para anticuerpos aPCC.

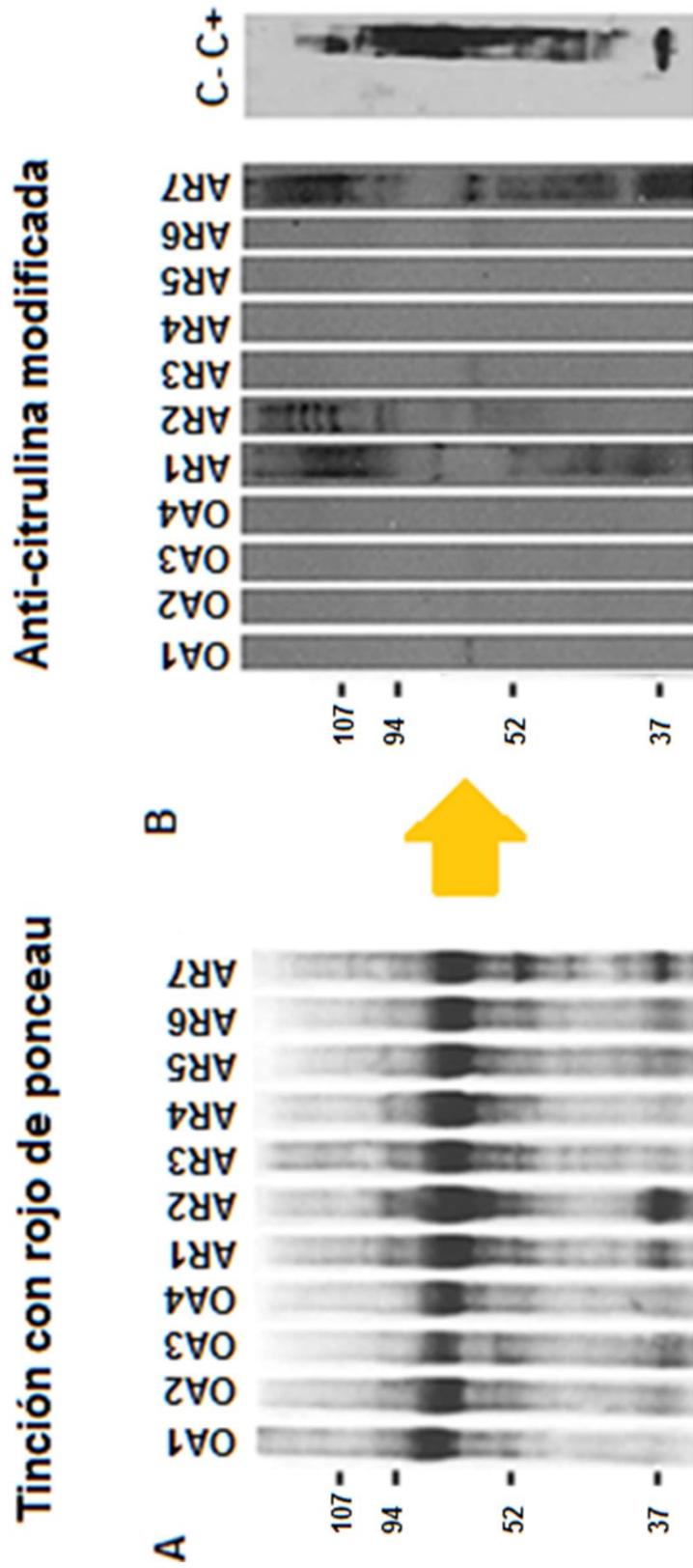


Figura 6 Diferente perfil de proteínas citrulinadas en muestras de tejido sinovial de pacientes con AR. Las proteínas de homogenizados de tejido sinovial fueron separadas por SDS-PAGE, transferidas a nitrocelulosa y teñidas con rojo de ponceau para visualizar la cantidad de proteínas por línea (A). Electroinmunotransferencia con un anticuerpo anti-citrulina modificada, visualizado por quimioluminiscencia (B). Muestras de tejido sinovial de OA (líneas 1-4) y AR (líneas 5-11). C- control negativo (lisado de células HEP-2). C+ control positivo (HEp-2 lisado citrulinado *in vitro*)

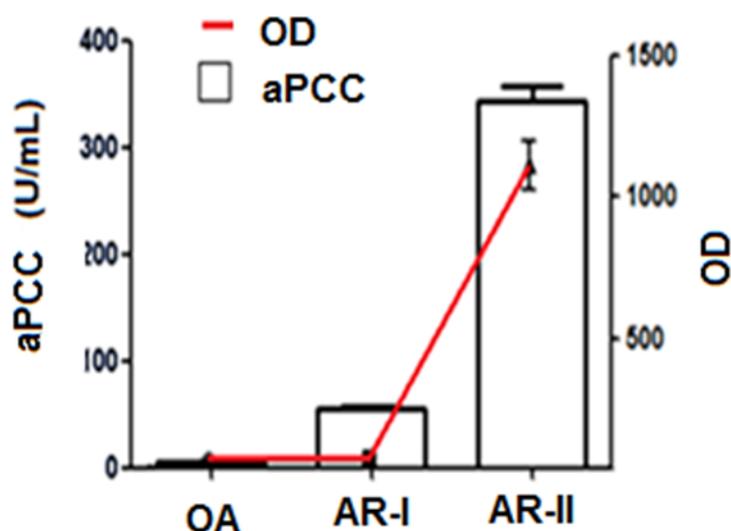


Figura 7. Relación entre la cantidad de proteínas citrulinadas y la concentración de anticuerpos aPCC.

Las muestras de AR fueron divididas de acuerdo a la cantidad de proteínas citrulinadas en el homogenizado de tejido sinovial: AR-I (RA3-RA6) con poca o nula presencia de proteínas citrulinadas; RA-II (RA1, RA2, RA7) con alto contenido de proteínas citrulinadas; OA (OA1-OA4). Densitometría (DO) fue utilizada como una medición indirecta de la cantidad de proteínas citrulinadas (línea). Los anticuerpos aPCC (U/mL) se midieron en muestras de suero de cada uno de los pacientes, por medio de ELISA (barras). Se muestra la media de cada grupo

6.2 Expresión de RNAm de *PADI2* y *PADI4* en tejido sinovial de pacientes con AR y OA.

Para analizar si la diferencia entre la cantidad de proteínas citrulinadas en tejido sinovial de AR con concentración alta de aPCC (AR-II: AR1, AR2, AR7) y tejido sinovial de AR con concentración baja de aPCC (AR-I: AR3-AR6), fue debido a la expresión de las enzimas PAD2 y PAD4 (enzimas responsables de la citrulinación en tejido sinovial), se midió la expresión RNAm de *PADI2* y *PADI4*, para lo cual, se analizaron 7 muestras de tejido sinovial de pacientes con AR (AR1-AR7) y 8 muestras de pacientes con OA (OA1-OA8).

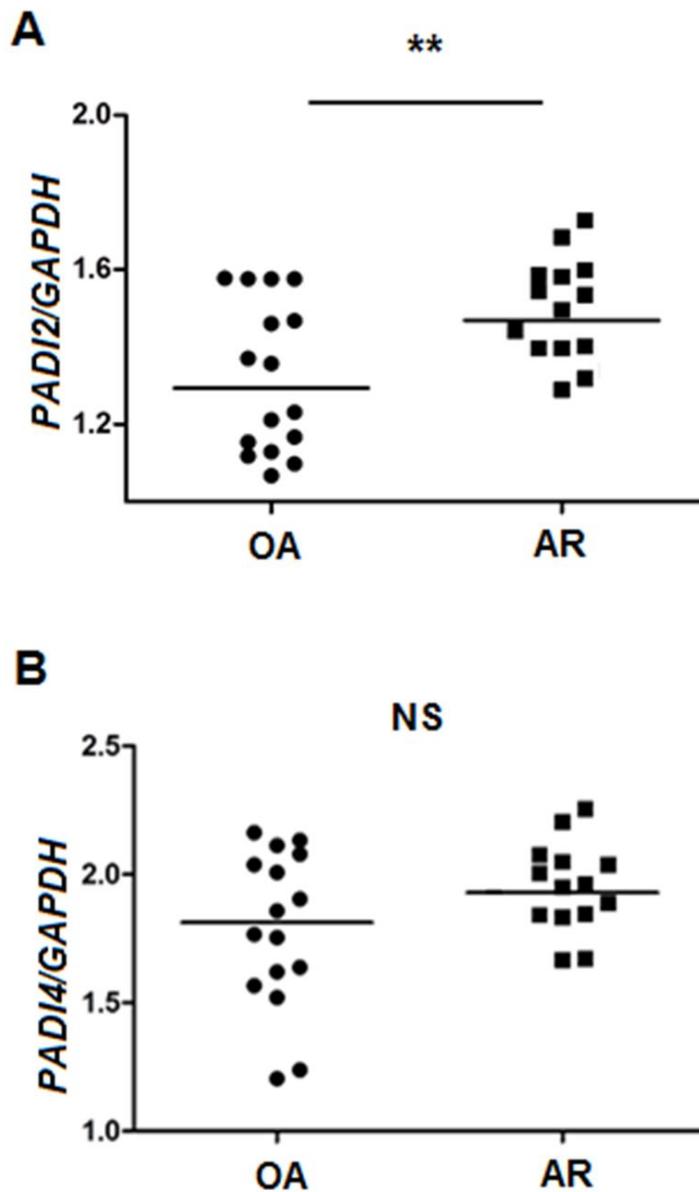


Figura 8. Expresión relativa del RNAm de *PADI2* y *PADI4* en tejido sinovial de pacientes con AR. El RNA fue purificado de homogenizados de tejido sinovial, Se realizó RT-PCR usando oligonucleótidos específicos. Los resultados fueron normalizados con *GAPDH*. Las gráficas muestran la expresión relativa de *PADI2* (A) y *PADI4* (B). las líneas horizontales indican la media. NS, no significativo, ** $p < 0.05$ prueba de U de Mann-Whitney

No se observaron diferencias en la expresión del RNAm de *PADI2* y *PADI4* en el tejido sinovial de pacientes con AR (AR-I y AR-II) (datos no mostrados). Sin embargo, si se observó diferencia en la expresión de *PADI2* entre el grupo de AR y OA ($p=0.02$) (Figura 8a). Aunque la expresión de *PADI4* ha sido asociada con la citrulinación de proteínas en el tejido sinovial de AR, no se observaron diferencias significativas en la expresión del RNAm de *PADI4* entre las muestras de AR y OA (Figura 8b). De acuerdo a estos resultados, las diferencias observadas entre la cantidad de proteínas citrulinadas en el grupo de AR no se relacionó con incremento en la expresión del RNAm de *PADI2* y *PADI4* en tejido sinovial. Además, debido al número pequeño de muestras analizadas no se encontró asociación entre la cantidad de proteínas citrulinadas en el tejido sinovial de AR con el tratamiento o duración de la enfermedad.

6.3 Expresión del RNAm de *PADI3* en tejido sinovial de pacientes con AR

Por otro lado, para analizar la expresión de RNAm de *PADI3*, se obtuvieron nuevas muestras de tejido sinovial. En tres de cuatro muestras de pacientes con AR (AR9-AR11) se detectó RNAm de *PADI3*, a diferencia de las muestras de OA, en donde fue indetectable dicha isoforma (OA9-OA12) (Figura 4). En estas mismas muestras se analizó la expresión del RNAm de *PADI2* y *PADI4*. La expresión del RNAm de *PADI2* fue similar en las muestras de AR y OA, en contraste, la expresión del RNAm de *PADI4* fue mayor en el grupo de AR vs OA (Figura 9).

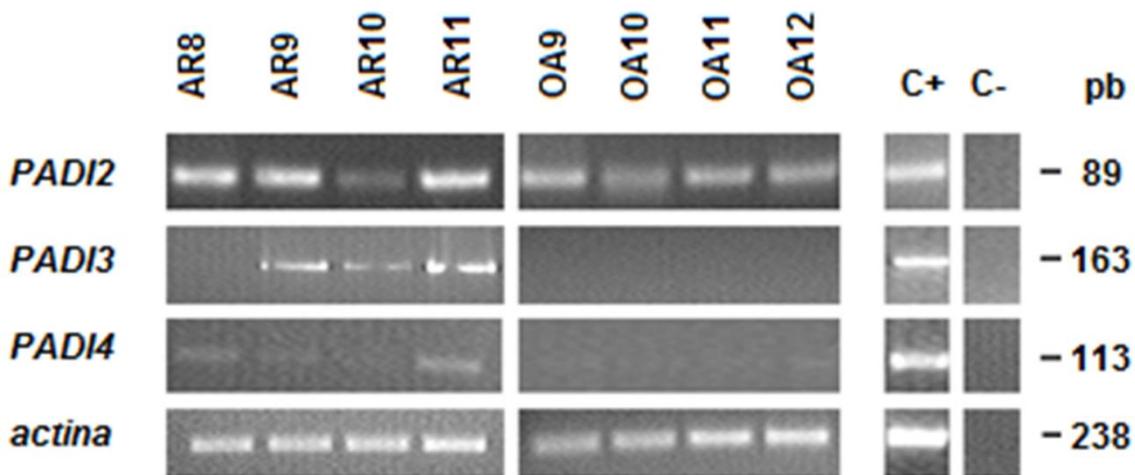


Figura 9. Expresión de RNAm de PADI3 en tejido sinovial de pacientes con AR. Se aisló RNA de tejido sinovial y se realizó RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos. La figura muestra los resultados representativos de varios experimentos realizados independientemente.

6.4 Expresión del RNAm de PADI2, PADI3 y PADI4 en sinoviocitos tipo fibroblastos de pacientes con AR

Aunque los sinoviocitos tipo fibroblastos no son la principal fuente de PADs en el tejido sinovial, se analizó la expresión del RNAm de *PADI2*, *PADI3* y *PADI4*, para elucidar cuál es la contribución de éstas células en la expresión global de dichas isoformas en el tejido sinovial. Para ello, se realizaron cultivos primarios a partir de muestras de tejido sinovial de pacientes con AR (AR8-AR11) y OA (OA9-OA12), después del cuarto pase, se midió la expresión de CD90 como marcador de sinoviocitos [70]. Se observó que los sinoviocitos tipo fibroblastos expresan RNAm de *PADI2*, *PADI4* y no expresan *PADI3* (Figura 10). No se observaron diferencias entre la expresión del RNAm de las PADs entre los sinoviocitos tipo fibroblastos de pacientes con AR y OA.

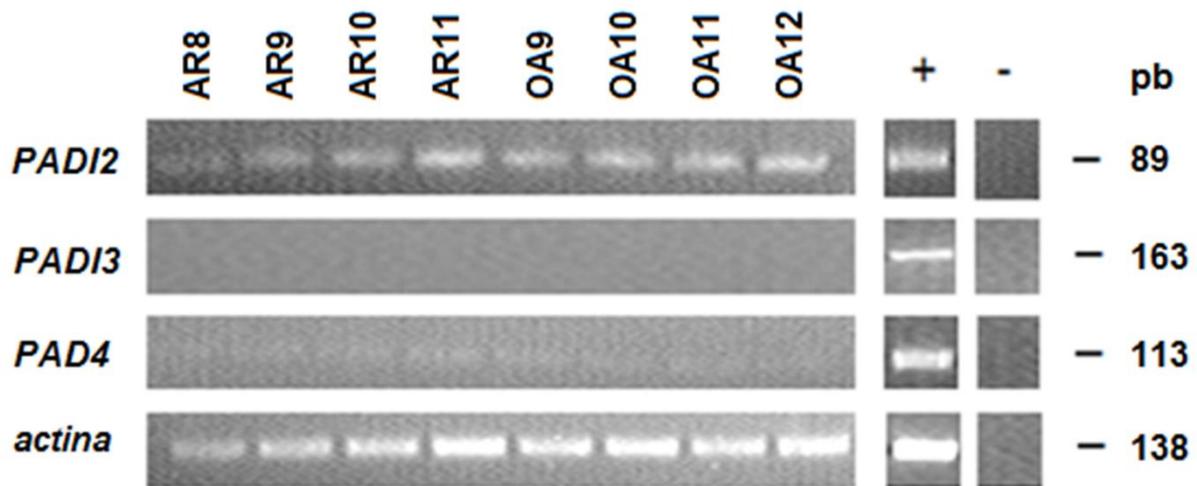


Figura 10. Expresión del RNAm de PADI2 y PADI4 en sinoviocitos tipo fibroblastos de pacientes con AR. Se realizaron cultivos primarios de sinoviocitos tipo fibroblastos, Se utilizó como marcador CD90, el cual fue expresado en más del 98% de las células después del cuarto pase. La expresión del RNAm de PADI2, PADI3 y PADI4 fue medido por RT-RT-PCR. La figura muestra los resultados representativos de varios experimentos realizados independientemente.

7. Discusión

La citrulinación de proteínas juega un papel importante en la generación y mantenimiento de la respuesta autoinmune en AR. Existen diversas proteínas citrulinadas que han sido propuestas como blancos antigénicos en AR entre las que se incluyen, al fibrinógeno [71,72], colágena [36,73] vimentina [38], y enolasa alfa [40]. En este trabajo se analizó la presencia y cantidad de proteínas citrulinadas en muestras de tejido sinovial de pacientes con AR y su asociación con la concentración de anticuerpos anti-proteínas citrulinadas en suero. Además, se midió la expresión del RNAm de *PADI2*, *PADI3* y *PADI4* en tejido sinovial y en sinoviocitos tipo fibroblastos.

Se observó que existe una gran variedad de proteínas citrulinadas en el tejido sinovial de pacientes con AR, no así en el tejido sinovial de pacientes con OA. Interesantemente, se encontró una relación entre la cantidad de proteínas citrulinadas en tejido sinovial y la concentración de anticuerpos aPCC circulantes en pacientes con AR; es decir, gran cantidad de proteínas citrulinadas en tejido sinovial y alta concentración de anticuerpos aPCC en suero. Por otra parte, se observó en ciertas muestras de tejido sinovial de pacientes con AR, con poca o nula presencia de proteínas citrulinadas, anticuerpos aPCC, aunque a títulos bajos. Estos resultados apoyan el concepto de que existen otros sitios, diferentes al tejido sinovial, en los cuales se generan proteínas citrulinadas antigénicas capaces de estimular la producción de anticuerpos aPCC en pacientes con AR, tales como los pulmones en fumadores [15] o por infección periodontal con *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) [74-76]. También, existe la posibilidad que exista

modificación de la cantidad de proteínas citrulinadas en el tejido sinovial de pacientes con AR debido al tratamiento [77].

Se ha documentado la presencia de proteínas citrulinadas en el lavado broncoalveolar de pacientes fumadores con AR, a diferencia de los controles no fumadores, en los cuales no han sido detectadas dichas proteínas [78]. Además, se sabe que el tabaquismo induce la activación de macrófagos, así como también un aumento en su capacidad presentadora de antígenos, y que los individuos con susceptibilidad genética HLA-DR-B1 (SE), desarrollan una respuesta inmune contra proteínas citrulinadas [48, 78]. Otro mecanismo de producción de proteínas citrulinadas antigénicas extra-articular en pacientes con AR ocurre durante una infección periodontal por la bacteria *P. gingivalis* [21, 79]. Recientemente, se ha reportado que la *P. gingivalis* produce la enzima peptidil arginina deiminasa (PADP), la cual tiene la capacidad de convertir residuos de arginina en citrulina [80]. De tal manera que la PADP podría estar involucrada en la falla de la regulación de la señalización y evasión del sistema inmune del hospedero. Un estudio demostró que la infección con *P. gingivalis* en el modelo DBA1/J antes de la inducción de artritis incrementa la activación del sistema inmune favoreciendo la respuesta celular Th17 y acelerando el desarrollo de artritis [81]. Además, algunos estudios han mostrado una asociación bidireccional entre periodontitis y AR. En comparación con la población en general, los pacientes con periodontitis tienen mayor riesgo de desarrollar AR y viceversa; en los pacientes con periodontitis tienen por lo menos dos veces más posibilidad de desarrollar AR [79, 82].

Por otro lado, en un estudio demostraron una disminución en la cantidad de proteínas citrulinadas en el tejido sinovial de pacientes con AR en respuesta al tratamiento con glucocorticoides, así como también una disminución de la

inflamación y de la expresión de las enzimas PAD2, PAD4 [77], lo cual sugiere que puede existir inhibición de la producción de proteínas citrulinadas en la sinovia de AR, lo cual a su vez podría reflejarse en la concentración de anticuerpos aPCC en suero, tal como observamos en este trabajo.

En este estudio no se encontró asociación entre la cantidad de proteínas citrulinadas y la expresión del RNAm de PAD2 y PAD4 en el tejido sinovial de pacientes con AR, contrariamente a ciertos estudios que reportan una correlación entre el grado de inflamación sinovial y la expresión de PAD2 y PAD4 [77]. En este sentido, se desconoce si las muestras analizadas en este estudio tenían el mismo grado y composición de infiltrado celular. Si hubiese sido el caso, se podría inferir que la diferencia en la cantidad de proteínas citrulinadas se debió a diferencias en la actividad de las enzimas PAD2 y PAD4, y no a la expresión por sí misma. Otra posible explicación es la presencia del haplotipo *PADI4* asociado con AR [49], inicialmente descrito en población asiática, el cual permite una mayor actividad enzimática. Además la presencia de dicho haplotipo confiere mayor estabilidad al mRNA de *PADI4*. Dada tal asociación resultaría interesante evaluar la influencia de los haplotipos de *PADI4* sobre la actividad enzimática en los subgrupos de AR clasificados de acuerdo a la cantidad de proteínas citrulinadas en el tejido sinovial.

Por otra parte, se identificó la expresión del RNAm de *PADI3* en el tejido sinovial de pacientes con AR, lo cual sugiere que PAD3 podría participar en la generación de proteínas citrulinadas antigénicas en el tejido sinovial de pacientes con AR, incluso PAD3 podría ser un blanco antigénico, como ha sido previamente reportado [58]. Aunque se demostró la presencia del RNAm de *PADI3*, aún es necesario demostrar la presencia a nivel de proteína.

En un estudio reciente, Chang y colaboradores proponen que existen ciertas características en común entre tejido tumoral y tejido sinovial de AR, como la angiogénesis, el depósito de fibrina, defectos en la proliferación celular, incremento en la coagulación, e incremento en la expresión de PAD4 [83]. En este trabajo se encontró expresión del RNAm de *PADI2* y *PADI4* en cultivos de sinoviocitos tipo fibroblastos de pacientes con AR. Aunque el papel de la expresión de PAD4 en los sinoviocitos tipo fibroblastos de AR no es clara, podría regular la expresión de ciertos genes a través de la citrulinación de histonas [39, 84, 85]. También es posible que PAD4 citruline la fibrina y fibronectina, y de esta manera afectar la interacción de dichas proteínas con sus receptores, consecuentemente, favoreciendo angiogénesis anormal y defectos en la proliferación celular [39]. Se requiere de otros estudios para elucidar el papel de la expresión de PAD2 y PAD4 en sinoviocitos tipo fibroblastos de pacientes con AR.

En resumen, se encontró una gran variabilidad de proteínas citrulinadas en el tejido sinovial de pacientes con AR y la cantidad de dichas proteínas está asociada con la concentración de anticuerpos aPCC en suero. Además, se identificó por vez primera en la literatura en inglés la expresión del RNAm de *PADI3* en el tejido sinovial y la expresión de *PADI2* y *PADI4* en sinoviocitos tipo fibroblastos en pacientes con AR

8. Conclusiones

- Existe una alta variabilidad de proteínas citrulinadas en tejido sinovial de pacientes con AR
- La cantidad de proteínas citrulinadas en el tejido sinovial de pacientes con AR se relaciona con la concentración de anticuerpos aPCC
- La *PADI3* se expresa en tejido sinovial de pacientes con AR
- Los sinoviocitos tipo fibroblastos expresan moderadamente *PADI2* y *PADI4*

9.Literatura citada

- [1] Iglesia-Gamarra A, Quintana G, Restrepo –Suárez JF. Prehistoria, historia y arte de la Reumatología. Revista Colombiana de Reumatología 2006; 13: 21-47
- [2] Buchanan WW and Kean Walter F. Rheumatoid arthritis as seen through long-distance spectacles. Inflammorheumatology 2001; 9: 3-22
- [3] Kunkel HG, Franklin and Muller-Eberhard HJ. Studies on the isolation and characterization of the “rheumatoid factor”. J Clin Invest. 1959; 38: 424-34
- [4] Fraser K and Waaler-Rose Test: Anatomy of the eponym. Sem Arthritis Rheum 1998;18: 61-71
- [5] Prete M, Racanelli V, Digiglio L, Vacca A et al. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis: An update. Autoimmunity reviews. 2011; 11: 123-31.
- [6] Peláez-Ballestas I, Sanin LH, Moreno-Montoya J et al. Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the CORCORP Methodology. J Rheumatol 2011 38:3-8
- [7] Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. Sem Arthritis Rheum 2006 36: 182-8
- [8] Aletaha D, Neodi T, Silman AJ et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria. Arthritis Rheum. 2010 62: 2569-81
- [9] Gaalen FA, Linn-Rasker SP, Venrooij WJ et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated predicts progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis. Arthritis Rheum. 2004; 50:709-15
- [10] Shellekens G, Visser H, van den Hoogen F et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognize a cyclic citrullinated peptide. Arthritis Rheum. 1999; 17: 689-97
- [11] Xiaofenz M, Maixing L, Xinping D et al. Diagnostic value of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol 2003; 30:1451-5

- [12] Nielen MN, van Schaardenburg D, Reesink HW et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2004; 50: 380-86
- [13] Lundberg K, Nijenhuis S, Vossenaar ER et al. Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: 458-67
- [14] Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ, The share epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 1205-13
- [15] Klareskog L, Stolt P, Lundberg K et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)- restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 38-46
- [16] Tarcsa E, Marecov L, Mei G et al. Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrate trichohyalin and filaggrin. *J Biol Chem* 1996; 271: 30709-716
- [17] György B, Tóth E, Tarcsa E et al. Citrullination: a postranslational modification in health and disease. *Int Biochem & Cell Biol.* 2006; 28- 1662-77
- [18] Chavanas S, Mechin M, Takahara H et al. Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase 4 gene clusters reveals highly conserved non coding-segments and new human gene *PADI6*. *Gene* 2004; 330: 19-27
- [19] Marotte H, Farge P, Gaudin P et al. The association between periodontal disease and joint destruction in rheumatoid arthritis extends the link between the HLA-DR shared epitope and severity of bone destruction. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 905-909
- [20] de Pablo P, Dietrich T, McAlinton TE. Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population. *J Rheumatol* 2008; 35: 70-6
- [21] Detert J, Pischon N, Bumester GR et al. The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis Res Ther* 2010; 12: 218
- [22] Senshu T, Kan S, Ogawa H et al. Preferential deimination of keratin K1 and filaggrin during the terminal differentiation of human epidermis. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 225: 712-19

- [23] Harauz G, Musse AA. A tale of two citrullines structural and functional aspects of myelin basic protein deimination in health and disease. *Neurochem Res* 2007 32: 137-58
- [24] Dong Y, Wysocka J, Lee Y et al. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylation. *Science* 2004; 306: 279-83
- [25] Tanikawa C, Ueda K, Nakanawa H et al. Regulation of protein citrullination through p53/PADI4 network in DNA damage response. *Cancer Res* 2009 69: 8761-9
- [26] Brinkmann V, Reichard U, Goosman C. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004 303: 1532-5
- [27] Neel I, Khan SN, Radic M. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J Immunol* 2008 180: 1895-902
- [28] Wang Yanming, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, Allis CD and Coonrod SA. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol* 2009 184: 205-213
- [29] Hill JA, Bell DA, Brintnell W et al. Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. *J Exp Med* 2008; 205: 967-79
- [30] Nijenhuis RL and Mandema E. A new serum factor in patients with rheumatoid arthritis: The antiperinuclear factor. *Ann Rheum Dis* 1964; 23: 302-5
- [31] Young BJ, Mallya RK, Leslie RD et al. Anti-keratin antibodies in rheumatoid arthritis. *Br Med J*. 1979; 2: 97-9
- [32] Sebbag M, Simon M, Vincent C et al. The antiperinuclear factor and the so called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*. 1995; 95:2672-9
- [33] Girbal-Neuhaser E, Duriex JJ, Arnaud M. The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilagrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filagrin by deimination of arginine residues. *J Immunol* 1999; 162: 585-94
- [34] Masson-Bessière C, Sebbag M, Girbal-Neuhaser E et al. The major synovial targets of the rheumatoid arthritis-specific antifilagrin autoantibodies are deiminated forms of the alpha- and beta-chains of fibrin. *J Immunol* 2001; 166: 4177–

- [35] Cook AD, Gray R, Ramshaw J et al. Antibodies against the CB10 fragment of type II collagen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004; 06: R477–83.
- [36] Suzuki A, Yamada R, Ohtake-Yamanaka M et al. Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333: 418–26.
- [37] Vossenaar ER, Després N, Lapointe E et al. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther.* 2004; 6: 142–50.
- [38] Tillemans K, Steendam K, Cantaert T et al. Synovial detection and autoantibody reactivity of processed citrullinated isoforms of vimentin in inflammatory arthritides. *Rheumatology.* 2008; 47: 597–604.
- [39] Chang X, Yamada R, Suzuki A et al. Citrullination of fibronectin in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Rheumatology* 2005; 44: 1374-82
- [40] Kinloch A, Tatzler V, Wait R et al. Identification of citrullinated alpha enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. 2005; 7:R1421
- [41] Cook A, Gray R, Ramshaw J et al. Antibodies against the CB10 fragment of type II in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: 477-83
- [42] Cornillet M, Sebbag M, Verrouil E et al. The fibrin-derived citrullinated peptide β 60-74Cit_{60, 72, 74} bears the major ACPA epitope recognized by the rheumatoid arthritis-specific anticitrullinated fibrinogen autoantibodies and anti-CCP2 antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014: 1246-52
- [43] Saulot V, Vittecoq O, Charlionet R et al. Presence of autoantibodies to the glycolytic enzyme alpha enolase in sera from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46:1196-201
- [44] Bang H, Egerer K, Gaudiard A et al. Mutation and citrullination modifies vimentin to a novel autoantigen for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 2503-11
- [45] Lundenberg L, Spengler L, Bang H et al. Restrictive IgG antibody response against mutated citrullinated vimentin predicts response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2015; 17: 206

- [46] Schellekens GA, Visser H, de Jong BA et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 155-63
- [47] Vossenaar ER, Smeets TJ, Kraan MC et al. The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3485-94
- [48] Wagner C, Skovole J, Lahey L et al. Identification of anticitrullinated protein antibody reactivities in a subset of anti-CCP negative rheumatoid arthritis: association with cigarette smoking and HLA-DRB1 shared epitope alleles. *Ann Rheum Dis* 2015; 74: 579-86
- [49] Suzuki, A, Yamada, R, Chang, X et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genetic* 2003; 34: 395-402.
- [50] Kang CP, Lee HS, Ju H et al. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans. *Arthritis Rheum*. 2006; 50: 90-96.
- [51] Du Y, Liu X, Guo JP et al. Association between PADI4 gene polymorphism and cyclic citrullinated peptide antibody positive rheumatoid arthritis in a large Chinese Han cohort. *Clin Exp Rheumatol* 2014; 32: 377-82
- [52] Ferucci ED, Darrah E, Smollik I. Prevalence of anti-peptidylarginine deiminase type 4 antibodies in rheumatoid arthritis and unaffected first degree relatives in indigenous North American populations. *J Rheumatol* 2003; 40: 1523-28
- [53] Auger I, Charpin C, Balandraud N et al. Autoantibodies to PAD4 and BRAF in rheumatoid arthritis. *Autoimmunity Review* 2012; 11: 801-3
- [54] Pollmann S, Stensland M, Hornes H et al. Anti-PAD4 autoantibodies in rheumatoid arthritis: levels in serum over time and impact on PAD4 activity as measured with a small synthetic substrate. *Rheumatol Int* 2012; 32: 1271-76
- [55] Halvorsen EH, Pollmann S, Gilboe IM et al. Serum IgG antibodies to peptidylarginine deiminase 4 in rheumatoid arthritis and associations with disease severity. *Ann rheum Dis* 2008; 67: 414-7
- [56] Zhao J, Zhao Y, He J et al. Prevalence and significance of anti-peptidylarginine deiminase 4 antibodies in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2008; 35: 969-74

- [57] Chang X, Yamada R, Suzuki T et al. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2005; 44: 40-50
- [58] Giles J, Darrah E, Danoff S et al. Association of cross-reactive antibodies targeting peptidyl arginine deiminase 3 and 4 with rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *PLOS ONE* 2014; 9: e98794
- [59] Szekanecz Z, Pakozdi A, Szentpetery A et al. Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Front Biosci* 2009; 1: 44-51
- [60] Polzer K, Baeten D, Soleiman A et al. Tumor necrosis factor blockade increases lymphangiogenesis in murine and human arthritic joints. *Ann Rheum Dis* 2008; 67: 1610-16
- [61] Miossec P, Korn T, Kunchroo VK et al. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009; 361: 888-98
- [62] Seyler TM, Park YW, Takemura S et al. BLYS and APRIL in rheumatoid arthritis. *2005 J Clin Invest* 2005; 115: 3083-92
- [63] Cascao R, Rosario HS, Souto Carneiro MM et al. Neutrophils in rheumatoid arthritis: more than simple final effectors. *Autoimmune Rev* 2010; 9 :531-35
- [64] Bradfield PF, Amft N, Vernon-Wilson E et al. Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes overexpress the chemokine stromal cell-derived factor 1 (CXCL12), which support distinct patterns and rates of CD4+ and CD8+ T cell migration with synovial tissue. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2472-82
- [65] Filer A, Parsonage G, Smith E et al. Differential survival of leucocyte subsets mediated by synovial, bone marrow, and skin fibroblasts: site-specific versus activation-dependent survival of T cells and neutrophils. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 2096-108
- [66] Aupperle KR, Boyle DL, Hendrix M et al. Regulation of synoviocyte proliferation, apoptosis, invasion by the p53 tumor suppressor gene. *Am J Pathol* 1998; 152: 1091-8
- [67] Schett G, Redlich K, Xu Q et al. Enhanced expression of heat shock protein 70 (hsp70) and heat shock factor 1 (HSF1) activation in rheumatoid arthritis synovial tissue: differential regulation of hsp70 expression and hsf1 activation in synovial fibroblast by proinflammatory drugs. *J Clin Invest* 1998; 102: 302-11
- [68] Rhee DK, Marcelino J, Baker M et al. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *J Clin Invest* 2005; 115: 132-42

- [69] Sabeh F, Fox D, Weiss SJ et al. Membrana type I matrix metalloproteinase dependent regulation of rheumatoid arthritis synoviocyte function. *J Immunol* 2010; 115: 622-31
- [70] Müller L U, Ospelr C, Gay S et al. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblast. *Arthritis Res Ther* 2007; 9: 223
- [71] Zhao X, Okeke NL, Sharpe O et al. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: R94
- [72] Hermansson M, Artemenko K, Ossipova E et al. MSanalysis of rheumatoid arthritic sinovial tissue identifies specific citrullination sites of fibrinogen. *Proteomics Clin Appl* 2010; 4: 511-18
- [73] Yoshida M, Tsuji M, Kurosaka D et al. Autoimmunity to citrullinated type II collagen in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2006; 18: 429-41
- [74] Marchant C, Smith M, Proudman S et al. Effect of *Porphyromonas gingivalis* on citrullination of proteins by macrophages *in vitro*. *J Periodonto* 2013; 84: 1272-80
- [75] Rutger PG Rheumatoid arthritis and periodontitis inflammatory and infections connections. *J Oral Microbiol* 4; 11829
- [76] Bongartz T, Cantaert T, Atkins SR. citrullination in extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis. *Reumatology* 2007; 46: 70-75
- [77] Makrygiannakis D, Shankar R, Engström M et al. Local administration of glucocorticoids decreased synovial citrullination in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 14: R20
- [78] Lugli EB, Coreia R, Fischer R et al. Expression of citrulline and homocitrulline residues in the lungs of non-smokers and smokers: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2015; 17:9
- [79] Koziel J, Mydel P, Potempa J. The link between periodontal disease and rheumatoid arthritis: An updated review. *Curr Rheumatol Rep* 2014; 16: 408
- [80] Quirke MA, Lugli EB, Wegner N et al. Heightened immune response to autocitrullinated *Porphyromonas gingivalis* peptidylarginine deiminase: a potential mechanism for breaching immunologic tolerance in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 201; 73: 263-69
- [81] Marchesan JT, Gerow EA, Shaff R et al. *Porphyromonas gingivalis* oral infection exacerbates the development and severity of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2013; 15: R186
- [82] Mikuls TR, Thiele GM, Deane KD et al. *Porphyromonas gingivalis* and disease related autoantibodies in individuals at increased risk of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2012; 64 : doi:10.1002/art.34595.

- [83] Chang X, Han J. Expression of peptidylarginine deiminase type 4 (PAD4) in various tumors. *Mol Carcinog* 2006; 45: 183-196
- [84] Dong S, Zhang Z, Takahara H et al Estrogen-enhanced peptidylarginine deiminase type IV gene (PADI4) expression in MCF-7 cells is mediated by estrogen receptor- α -promoted transactors activator protein-1, nuclear factor- κ B and Sp1. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 1617-29
- [85] Nakahima K, Arai S, Nariai Y et al. PAD4 regulates proliferation of multipotent haematopoietic cells by controlling c-myc expression. *Nat Commun* 2013; 4: 1836

The amount of citrullinated proteins in synovial tissue is related to serum anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibody levels

Elizabeth Olivares-Martínez¹ · Diego F. Hernández-Ramírez¹ · Carlos A. Núñez-Álvarez¹ · Antonio R. Cabral¹ · Luis Llorente¹

Received: 11 March 2015 / Revised: 29 July 2015 / Accepted: 30 July 2015
© International League of Associations for Rheumatology (ILAR) 2015

Abstract The objective of this study was to determine the relationship between citrullinated proteins in synovial tissue with peripheral anti-citrullinated peptides autoantibodies (ACPA) and peptidylarginine deiminase (*PADI*) *PADI2*, *PADI3*, and *PADI4* messenger RNA (mRNA) expressions in synovial tissue and fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis (RA) patients. Eleven RA and 12 osteoarthritis (OA) patients who underwent knee replacement surgery were studied. We detected citrullinated proteins in synovial tissue homogenates by western blot and serum ACPA by ELISA to anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibodies, and *PADI2*, *PADI3*, and *PADI4* mRNA expressions in synovial tissue and in fibroblast-like synoviocytes. Patients with high amount of citrullinated proteins in synovial tissue (3 out of 7) have high levels of anti-CCP in serum. However, in the remaining 4 patients, the amount of synovial citrullinated proteins was minimal and their sera showed low levels of anti-CCP antibodies. Furthermore, we observed an increase in *PADI2* mRNA expression in RA synovial tissue compared with OA patients ($p=0.02$). We detected *PADI3* mRNA in the synovial tissue of RA patients, but not in the tissue of OA patients. Even though fibroblast-type synoviocytes in RA are not the main source of PADs in the synovial tissue, they express *PADI2* mRNA moderately, *PADI4* mRNA weakly, while there is no detectable expression of *PADI3* mRNA. In conclusion, we found a variety of citrullinated proteins in the synovial tissue of RA patients and the amount of such proteins

is related to serum concentration of anti-CCP antibodies. We identified the presence of *PADI3* mRNA expression in synovial tissue and *PADI2* and *PADI4* mRNA expressions in fibroblast-like synoviocytes from patients with RA.

Keywords Anti-citrullinated protein antibodies · Citrullinated proteins · Peptidyl arginine deiminase · Rheumatoid arthritis

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease of multifactorial etiology characterized by chronic inflammation of the joints and the presence of anti-citrullinated protein autoantibodies (ACPA) [1]. ACPA are a variety of autoantibodies that recognize different citrullinated proteins and which may be present in serum years before the onset of the rheumatoid disease [2]. Citrullination of proteins is a post-translational modification that causes the conversion of arginine to citrulline. At the protein level, the reaction causes a reduction in the molecular mass of approximately 1.0 Da for each modified arginine. The positive charge of the arginine is lost, so that the isoelectric point is also changed, and interactions with other proteins can be affected [3]. In humans, citrullination is catalyzed by the enzyme peptidylarginine deiminase (PAD), which may exist in five isoforms (PAD1, PAD2, PAD3, PAD4, and PAD6) with differential expression in tissues and organs. Although PAD2 and PAD4 are considered the most important isoforms in the family of RA-related PADs [4], a recent study described a subgroup of patients with RA and interstitial pulmonary disease with anti-PAD3 [5]. It is not yet clear, however, whether these antibodies are specifically against PAD3 or whether they correspond to antibodies with crossed reactivity against PAD4. Few

✉ Luis Llorente
luisllorentepeters57@gmail.com

¹ Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15. Tlalpan, 14000, México, D.F., Mexico

studies have analyzed the expression of PAD3 in the synovial tissue from RA patients [4].

It is known that inflammatory cells such as monocytes, macrophages [6], neutrophils [7], and T and B cells [8] express PAD2 and PAD4; however, little is known regarding the production of these enzymes by normal or RA fibroblast-like synoviocytes [8], cells that actively participate in the characteristic synovial proliferation observed in RA patients [9].

While the presence of citrullinated proteins is not unique to the inflamed synovium of RA, for they have been detected in other arthropathies [10], the presence of ACPA is highly specific for RA [11]. A great heterogeneity of citrullinated proteins in the synovial tissue of RA patients has been reported [12], and there are several studies that support the idea that these proteins play an important role in its pathogenesis [13, 14]. However, it is unknown whether there is a relationship between the amount of citrullinated proteins in RA synovia and circulating ACPA titers. Therefore, the aim of this study has been to determine the relationship between citrullinated proteins in synovial tissue with peripheral ACPA in patients with RA and with the peptidylarginine deiminases (*PADIs*) messenger RNA (mRNA) in the synovial tissue and fibroblast-like synoviocytes.

Methodology

Patients

We obtained 11 samples of synovial tissue from RA patients (all female), with a mean age of 53 years (range 45–68 years), a mean evolution of 22 years (range 5–33 years), and treated with methotrexate (63 %), prednisone (45 %), hydroxychloroquine (36 %), sulfasalazine (27 %), and leflunomide (27 %). All these patients showed positive anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibodies, mean 174 U/mL (range 46.4–366 U/mL); 90 % of patients were in remission at the time when samples were taken. We obtained samples of synovial tissue from 12 osteoarthritis (OA) patients (10 females), with a mean age of 77 years (range 68–88 years) and a mean evolution of 15 years (range 3–27 years). All these patients were receiving NSAID and proved negative for anti-CCP antibodies, mean 4.8 U/mL (range 3.8–6.4 U/mL). All synovial biopsies were carried out during knee replacement surgery. Blood samples were obtained from each patient for serological studies. All RA patients met the American College of Rheumatology 1987 revised criteria for RA [15]. The local institutional review board approved this study. All patients gave their written informed consent.

Preparation of synovial tissue samples

Synovial tissue samples were fragmented and homogenized in a lysis buffer (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1.0 mM DTT, and 1 mM PMSF). Next, the samples were frozen and thawed three times and then centrifuged at 4 °C for 10 min. The supernatants were collected and its protein concentration was determined using bicinchoninic acid method. The supernatants were stored at –20 °C until use.

Cell culture

Synovial tissue was fragmented and incubated in a solution of collagenase type IV (0.025 g/10 mL) (SIGMA, St Louis, MO, USA). Tissue debris was removed and supernatant was centrifuged. The pellet was resuspended in Dulbecco's modified Eagle medium (GIBCO, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) with 10 % FBS (GIBCO) and transferred to a culture dish. After four culture passages (approx. 80 % confluence), the CD90 expression [16] was studied by flow cytometry (BD Accuri C6 flow cytometer, Piscataway, NJ, USA) using an anti-CD90 (Thy.1) FITC-conjugated human antibody (eBioscience San Diego, CA, USA).

Isolation of RNA and RT-PCR amplifications

Total RNA was isolated from the synovial tissue using TRIzol reagent (GIBCO) and reverse-transcribed to generate cDNAs using Two-Step quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR; Invitrogen, Carlsbad CA). The *PADI2*, *PADI3*, and *PADI4* mRNA genes were amplified by PCR reactions and normalized to the expression level of the *GAPDH* or *β actin* gene. PCR conditions were as follows: *PADI2* sense 5' CTCCCAGACCAGCATACTT 3'; *PADI2* anti-sense 5' AAGGACCAGGCAAGAGAAGAT 3'; *PADI3* sense 5' GGTGAACTGTGACCGTGATG 3'; *PADI3* anti-sense 5' GCTGGAGGTATGGAGGACAA 3'; *PADI4* sense 5' TGGAACATG GTGCCCTGAG 3'; *PADI4* anti-sense 5' GGGAGCCACAATATTCACAAGA 3'; *GAPDH* sense 5' CATGTTCCAATATGATTCCAC 3' and *GAPDH* anti-sense 5' CCTGGAAGATGG TGATG 3'; *β actin* sense 5' GGGTCAGAAGGATTCCTA 3'; *β actin* anti-sense 5' GGTCTCAAACATGATCTG 3'. PCR amplification of *PADI2*, *PADI3*, *PADI4*, and *β actin* was carried out using the following conditions: 1 cycle 50 °C for 15 min; 1 cycle 95 °C 2 min; and 35 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 30 s. For *GAPDH* 1 cycle 50 °C for 15 min; 1 cycle 95 °C for 2 min; and 35 cycles of 95 °C for 15 s and 64 °C for 30 s.

In vitro citrullination

HEp-2 lysate was citrullinated in vitro with rat muscle PAD (SIGMA) using 0.5 U PAD/mg of lysate for 3 h at 55 °C in

buffer containing 0.1 M Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, and 5 mM DTT, pH 7.4. The reaction was stopped by the addition of 0.5 M EDTA to a final concentration of 20 mM.

Detection of citrullinated proteins in synovial tissue

The samples were separated by SDS-PAGE. Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes and citrullinated proteins were detected by using an anti-modified citrulline (anti-MC) detection kit (Upstate Biotechnology, Temecula, CA). Briefly, citrulline residues of the membranes immobilized proteins were modified by 2, 3-butanedione monoxime and antipyrine in a strong acid solution according to manufacturer's instructions. The modified citrulline residues were then detected with rabbit polyclonal anti-MC antibodies (Upstate Biotechnology) and a goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase (HRP) antibody conjugate (Upstate Biotechnology) using a chemiluminescent substrate for HRP.

Detection of ACPA

ACPA serum levels were measured using a commercial Quanta Lite CCP3 IgG ELISA (Inova Diagnostics, Inc. San Diego, CA, USA). Results were quantified and the cutoff value (20 U/mL) was set according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Mann-Whitney *U* test was used to determine differences between groups. We used GraphPad software version 5.0 (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA). We considered *p* values of less than 0.05 to be significant.

Results

Synovium citrullinated protein levels are associated with serum ACPA in RA patients

We asked whether there is a relationship between the amounts of citrullinated proteins in RA synovium and the serum ACPA concentration. Interestingly, we observed a considerable amount of citrullinated proteins in three out of seven (42 %) synovial tissue samples from RA patients (RA1, RA2, and RA7), while in the four remaining ones, only a few could be detected (RA3, RA4–RA6). In contrast, only one band of about 57 kDa could be detected in OA samples (OA1) (Fig. 1). We then analyzed the relationship between the amount of citrullinated proteins in the synovial tissue and anti-CCP antibody serum concentration in each patient. For RA patients, we found that synovial tissue samples with the highest number of bands, corresponding to citrullinated proteins, had the highest concentration of serum antibodies (R-II; >300 U/mL), while samples with little or no presence of citrullinated proteins had a low serum anti-CCP antibodies concentration (R-I; 40–70 U/mL) (Fig. 2). Moreover, in the OA group, all samples were negative for anti-CCP antibodies and the presence of citrullinated proteins was virtually undetectable.

PADI2 and *PADI4* mRNA expression in synovial tissue of RA and OA patients

In order to investigate whether the difference between the amount of citrullinated proteins in the synovial tissue of patients with high serum concentration of anti-CCP antibodies (>300 U/mL) (RA-II: RA1, RA2, RA7) and in the tissue of patients with low concentration of anti-CCP antibodies (40–70 U/mL) (RA-I: RA3–RA6) was due to differences in *PADI2* and *PADI4* isoform expression, we analyzed *PADI2* and *PADI4*

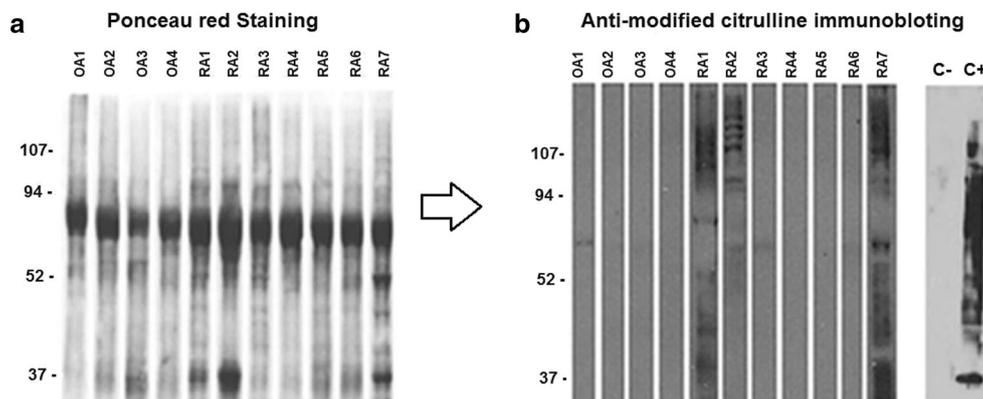


Fig. 1 Different citrullinated proteins profile between synovial tissue samples of RA patients. Proteins in extracts of synovial tissue were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and stained with Ponceau red to visualize the amount of protein per line (a).

Anti-MC immunoblotting visualized by chemiluminescence (b). Sample synovial tissue from OA (lines 1–4) and RA patients (lines 5–11). C–, negative control (HEp-2 lysate); C+, positive control (HEp-2 lysate citrullinated in vitro)

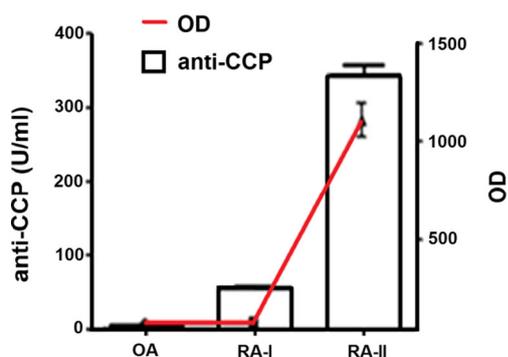


Fig. 2 Association between the amount of citrullinated proteins and anti-CCP antibodies levels. The RA samples were divided according to the amount of citrullinated protein in homogenized synovial tissue; RA-I (RA3–RA6) with little or no citrullinated proteins and RA-II (RA1, RA2, RA7) with high content of citrullinated proteins and OA (OA1–OA4). Densitometry (OD) was used as an indirect measurement of the amount of citrullinated proteins (line). The measurement of anti-CCP antibodies (U/mL) was performed by ELISA (bars). Shown are the mean of every group

mRNA in the synovial tissue, seven RA (RA1–RA7) and eight OA (OA1–OA8). No differences in *PADI2* and *PADI4* mRNA expressions in the synovial tissue of RA-I and RA-II patients were seen in either group (data not show), whereas the *PADI2* mRNA expression was significantly higher in the RA group vs the OA group ($p=0.02$) (Fig. 3a). However, although the PAD4 isoform has been associated primarily with citrullination in RA, no significant differences in its mRNA were detected between the RA vs the OA groups (Fig. 3b). According to our results, the observed difference between the amounts of citrullinated proteins in the same group of RA was not associated with higher *PADI2* and *PADI4* mRNA expressions in the synovial tissue. Furthermore, possibly due to the small number of samples analyzed, we found no association between the amount of citrullinated proteins in the synovial tissue of RA patients neither with treatment nor with disease duration.

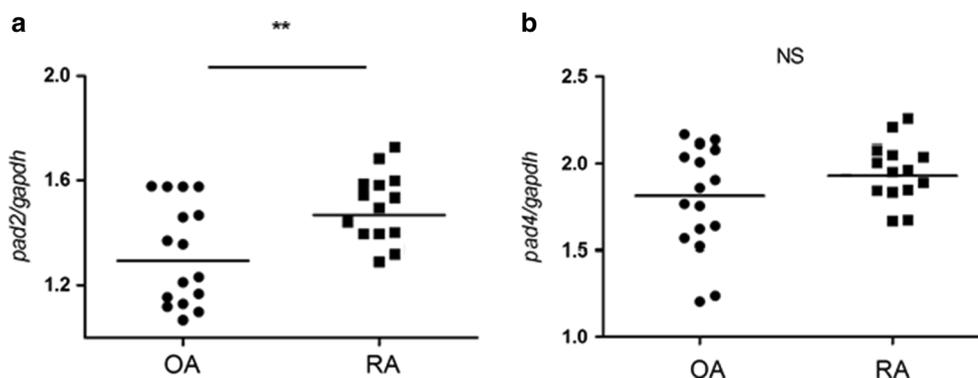


Fig. 3 Relative *PADI2* and *PADI4* mRNA expressions in the synovial tissue of OA (dots) and RA (squares) patients. RA patients. RNA was isolated from the synovial tissue homogenates and subjected to RT-PCR using specific primers. The data were normalized for *GAPDH* as a

PADI3 mRNA expression in synovial tissue from RA patients

To analyze the *PADI3* mRNA expression, we obtained new samples of the synovial tissue. In three out of four samples from RA patients (RA9–RA11), we detected *PADI3* mRNA, as opposed to the samples from OA patients, in which such isoform was not detectable (OA9–OA12) (Fig. 4). With the same samples, we analyzed the *PADI2* and *PADI4* mRNA expressions. The *PADI2* mRNA expression was similar for both groups, contrasting with the *PADI4* mRNA expression, which was greater in the RA group (Fig. 4).

PADI2, *PADI3*, and *PADI4* mRNA expressions in fibroblast-like synoviocytes from RA patients

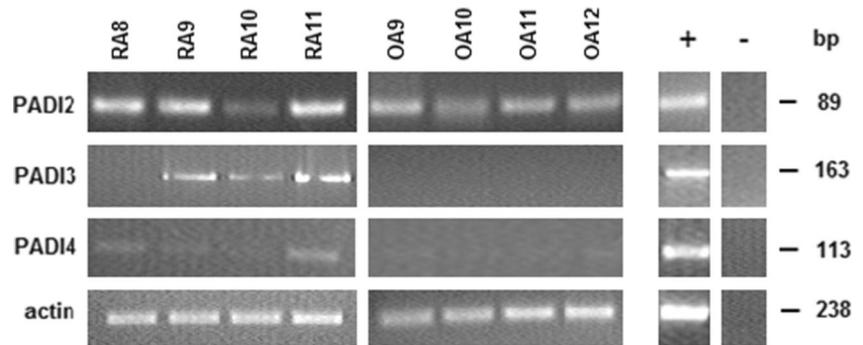
Even though fibroblast-like synoviocytes are not the main source of PAD2 and PAD4 in the synovial tissue, we analyzed the *PADI2*, *PADI3*, and *PADI4* mRNA expressions in primary cultures obtained from the samples analyzed under the previous heading to establish what was their contribution in the global expression of such PADs in the synovial tissue. We observed that fibroblast-like synoviocytes do express *PADI2* mRNA and, apparently, do have a certain contribution in the *PADI2* mRNA expression observed in the synovial tissue. By contrast, the *PADI4* mRNA expression is low and for *PADI3* mRNA undetectable (Fig. 5). We did not observe any differences in the *PAD* mRNA expression between the fibroblast-like synoviocytes of the RA and OA groups.

Discussion

Protein citrullination plays an important role in the generation and maintenance of the RA autoimmune response. There are several antigenic citrullinated proteins that have been related

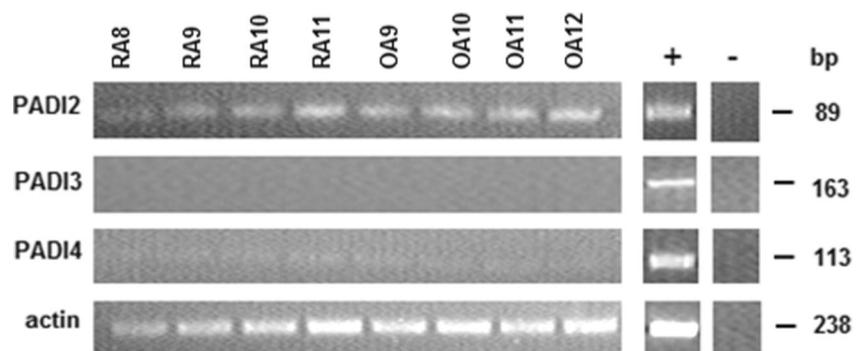
reference and the relative *PADI2* (a) and *PADI4* (b) mRNA expressions are depicted in the graph. Shown are the medians of duplicates. NS not significant; ** $p<0.05$ Mann-Whitney *U* test

Fig. 4 *PADI3* mRNA expression in the synovial tissue of RA patients. RNA was isolated from synovial tissue homogenates and subjected to RT-PCR using specific primers. The figure depicts representative results of several experiments conducted independently



to RA. These include fibrinogen [17, 18], collagen [19, 20], vimentin [21], and alpha enolase [22]. Herein, we analyzed the presence and amount of citrullinated proteins in synovial tissue samples from RA patients and its possible association with serum ACPA levels, as well as the synovial tissue expression of mRNA for *PADI2* and *PADI4*. We observed a great variability of citrullinated proteins in synovial tissue from RA patients whereas little, if any, citrullination was noted in OA synovial tissue samples. Interestingly, we found a significant relationship between the amounts of synovial tissue citrullinated proteins and circulating anti-CCP antibodies in RA patients; that is to say, the higher the amounts of citrullinated proteins in synovial tissue, the higher the peripheral levels of anti-CCP antibodies. It is worth mentioning, however, that we observed some citrullinated proteins in the synovial tissue with positive (although at low levels) serum anti-CCP antibodies. These results suggest another potential source of citrullinated antigens that allows the generation of anti-CCP antibodies, such as the lungs in smokers [23] or periodontal infection with *Porphyromonas gingivalis* [24–26]. On the other hand, the decrease of citrullinated proteins in synovial tissue has been observed with glucocorticoid therapy, where these drugs altered the expression of these proteins as well as that of PAD2 and PAD4 enzymes resulting in decreased inflammation [27]. Another possible scenario is that of the anti-CCP+ and anti-CCP– patients [28, 29], where it can be postulated a high synovial tissue production of citrullinated proteins in the former and few, if any, in the latter.

Fig. 5 *PADI2*, *PADI3*, and *PADI4* mRNA expressions in fibroblast-like synoviocytes from RA patients. More than 98 % of cells expressed CD90 after the fourth pass. *PADI2*, *PADI3*, and *PADI4* and β -actin mRNA expressions were measured by RT-PCR. The figure shows representative results of several experiments conducted independently



Unfortunately, we did not include anti-CCP– patients in our study to support this assertion.

We found no association between the amounts of citrullinated proteins with *PADI2* or *PADI4* mRNA expression in synovial tissue of RA patients, despite the fact that there have been reports of a correlation between the degree of synovial inflammation and the expression of PAD2 and PAD4 [27]. In this regard, we do not know if all the RA samples analyzed in that report had the same degree and composition of the cellular infiltrate. If this were the case, we can infer that the difference in the amount of citrullinated proteins in the synovial tissue detected in our patients was due to an increased PAD2 and PAD4 activity, and not to its enhanced expression, for we did not find any differences in their mRNA quantification. Another possible explanation is the presence of the *PADI4* haplotype, initially described in Japanese and Korean populations, which allows higher enzymatic activity [30]. Moreover, this haplotype associated to RA confers higher stability of *PADI4* mRNA. Given this association, it would be interesting to evaluate the *PADI4* haplotype's influence on the enzymatic activity in RA subgroups selected according to the amount of citrullinated proteins in their synovial tissue.

On the other hand, we did confirm the presence of the mRNA of *PADI3* in the synovial tissue of RA patients, which suggests that PAD3 could take part in the generation of antigenic citrullinated proteins in the synovial tissue of RA; PAD3 could even be an antigenic target, as has been previously

reported [5]. Although we could show the presence of the mRNA of *PADI3*, the analysis must still be made to ascertain the expression at the protein level.

Chang et al., proposed that there are several features in common between tumor tissues and synovial RA tissue such as angiogenesis, fibrin deposition, defects in cell proliferation, increased coagulant activity, and increased expression of PAD4 [31]. Herein, we observed mRNA of *PADI2* and *PADI4* in cultured RA and OA fibroblast-like synoviocytes. Although the role of PAD4 expression in fibroblast-like synoviocytes in the pathogenesis of RA is still unclear, one possibility is that PAD4 catalyzes the citrullination of histones and in turn modify the expression of genes [32–34]. It is also possible that PAD4 citrullinates fibrin and fibronectin, hence their interaction with growth factor receptors, and consequently, causes abnormal angiogenesis and defective cell proliferation [35]. Further studies are required to elucidate the significance of the expression of PAD2 and PAD4 in RA fibroblast-like synoviocytes.

In summary, we found a great variability of citrullinated proteins in the synovial tissue of RA patients and their amount is related to that of serum anti-CCP antibody concentration. We identified the presence of *PADI3* mRNA expression in the synovial tissue and *PADI2* and *PADI4* mRNA expressions in fibroblast-like synoviocytes from patients with RA.

Acknowledgments This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the Universidad Nacional Autónoma de México. Elizabeth Olivares-Martínez acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT). We dedicate this work to the memory of Dr. Javier Cabiedes.

Disclosures None.

References

1. Van Venrooij WJ, Pruijn GJ (2000) Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2:249–251
2. Nielen MN, van Schaardenburg D, Reesink HW et al (2004) Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* 50:380–386
3. Tarcsa E, Marecov L, Mei G et al (1996) Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationship of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J Biol Chem* 271:30709–30716
4. Foulquier C, Sebbag M, Clavel C et al (2007) Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis Rheum* 56:3541–3553
5. Giles JT, Darrah E, Danoff S et al (2014) Association of cross-reactive antibodies targeting peptidyl-arginine deiminase 3 and 4 with rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *PLoS One* 9, e98794. doi:10.1371/journal.pone.0098794
6. Vossenaar ER, Radstake TR, van der Heijden A et al (2004) Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis* 63:373–381
7. Asaga HK, Kakashima T, Senshu A et al (2001) Immunocytochemical localization of peptidylarginine deiminase in human eosinophils and neutrophils. *J Leukocyte Biol* 70:46–51
8. Chang X, Yamada R, Suzuki A (2005) Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 44:40–50
9. Neumann E, Lefevre S, Zimmermann B, Gay S et al (2010) Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblast. *Trends Mol Med* 10:458–58
10. Vossenaar ER, Smeets TJ, Kraan MC et al (2004) The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum* 50:3485–3494
11. Schellekens GA, Visser H, de Jong BAW et al (2000) The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognized a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum* 43:155–163
12. Matsuo K, Xiang Y, Nakamura H et al (2006) Identification of novel citrullinated autoantigens of synovium in rheumatoid arthritis using a proteomic approach. *Arthritis Res Ther* 8:R175
13. Lundberg K, Nijenhuis S, Vossenaar ER et al (2005) Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. *Arthritis Res Ther* 7:R458
14. Hill JA, Bell DA, Brintnell W et al (2003) The conversion of arginine to citrulline allows for a high-affinity peptide interaction with the rheumatoid arthritis-associated HLA-DRB1*0401 MHC class II molecule. *J Immunol* 171:538–541
15. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA et al (1988) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315–324
16. Müller-Ladner U, Ospelt C, Gay S et al (2007) Synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 9:R223
17. Zhao X, Okeke NL, Sharpe O et al (2008) Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 10:R94
18. Hermansson M, Artemenko K, Ossipova E et al (2010) MS analysis of rheumatoid arthritic synovial tissue identifies specific citrullination sites on fibrinogen. *Proteomics Clin Appl* 4:511–518
19. Suzuki A, Yamada R, Ohtake-Yamanaka M et al (2005) Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 333:418–426
20. Yoshida M, Tsuji M, Kurosaka D et al (2006) Autoimmunity to citrullinated type II collagen in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 18:429–441
21. Tilleman K, van Steendam K, Cantaert T et al (2008) Synovial detection and autoantibody reactivity of processed citrullinated isoforms of vimentin in inflammatory arthritides. *Rheumatology* 47:597–604
22. Kinloch A, Tatzer V, Wait R et al (2005) Identification of citrullinated alpha-enolase as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7:R1421
23. Klareskog L, Stolt P, Lundberg K et al (2006) A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum* 54:38–46
24. Marchant C, Smith M, Proudman S et al (2013) Effect of porphyromonas gingivalis on citrullination of proteins by macrophages in vitro. *J Periodontol* 84:1272–1280
25. Rutger PG (2012) Rheumatoid arthritis and periodontitis-inflammatory and infectious connections. *J Oral Microbiol* 4:11829

26. Bongartz T, Cantaert T, Atkins SR et al (2007) Citrullination in extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 46:70–75
27. Makrygiannakis D, Shankar R, Engström M et al (2012) Local administration of glucocorticoids decreased synovial citrullination in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 14:R20
28. Daha NA, Toes RE (2011) Rheumatoid arthritis: are ACPA-positive and ACPA-negative RA the same disease? *Nat Rev Rheumatol* 7: 202–203
29. Ohmura K, Terao C, Maruya E et al (2010) Anti-citrullinated peptide antibody negative RA is a genetically distinct subset: a definitive study using only bone erosive ACPA negative rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 49:2298–2304
30. Suzuki A, Yamada R, Chang X et al (2003) Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genetics* 34:395–402
31. Chang X, Han J (2006) Expression of peptidylarginine deiminase type 4 (PAD4) in various tumors. *Mol Carcinog* 45:183–196
32. Wang Y, Wysocka J, Sayegh J et al (2004) Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination. *Science* 306:279–283
33. Dong S, Zhang Z, Takahara H (2007) Estrogen-enhanced peptidylarginine deiminase type IV gene (PADI4) expression in MCF-7 cells is mediated by estrogen receptor- α -promoted transactors activator protein-1, nuclear factor-Y and Sp1. *Mol Endocrinol* 21:1617–1629
34. Nakashima K, Arai S, Nariai Y et al (2013) PAD4 regulates proliferation of multipotent haematopoietic cells by controlling c-myc expression. *Nat Commun* 4:1836
35. Chang X, Yamada R, Suzuki A et al (2005) Citrullination of fibronectin in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Rheumatology* 44: 1374–1382