



## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
CAMPO DE CONOCIMIENTO: INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD  
CAMPO DISCIPLINARIO: BIOQUÍMICA CLÍNICA

FACTORES MOLECULARES DE RIESGO EN PAD2 (*PADI2*) Y PAD4 (*PADI4*)  
ASOCIADOS AL DESARROLLO DE NEUMOPATÍA INTERSTICIAL DIFUSA (NID)  
EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE (AR)

### TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN  
SALUD

PRESENTA:

Q.F.B. KAROL JAZMIN NAVA QUIROZ

TUTOR PRINCIPAL:

DR. RAMCÉS FALFÁN VALENCIA

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

COMITÉ TUTOR:

DR. JORGE ROJAS SERRANO, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

DR. JOSÉ MANUEL RODRÍGUEZ PÉREZ, Instituto Nacional de Cardiología

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Agosto 2019.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

---

---

**Factores moleculares de riesgo en PAD2 (*PADI2*) y PAD4 (*PADI4*) asociados al desarrollo de neumopatía intersticial difusa (NID) en pacientes con artritis reumatoide (AR).**

**Índice de contenido**

Índice de figuras	4
Abreviaturas	8
Abstract	11
1) Introducción	12
2) Marco teórico	14
Neumopatía intersticial difusa (NID)	14
Artritis Reumatoide	17
Tabaquismo como factor de riesgo	19
Peptidil arginina deiminadas (PAD)	20
Localización y estructura génica de las PAD	22
Participación de las PAD en patología	24
Citruilación de proteínas en pacientes con neumopatía intersticial difusa y artritis reumatoide	26
Estudios de asociación de SNP en genes <i>PADI</i>	28
3) Planteamiento del problema	31
4) Justificación	34
5) Hipótesis	35
6) Objetivos	35
Objetivo general	35
Objetivos específicos	35
7) Materiales y métodos	36
Cálculo del tamaño de muestra	36
Consideraciones éticas	36
Grupos de estudio	37
Criterios de inclusión	38
Criterios de exclusión	39
Criterios de eliminación	39
Obtención de muestras biológicas:	39

---

---

Extracción de DNA	39
Obtención de LBA	40
Genotipificación	41
Cuantificación de PAD2 y PAD4	42
Análisis de resultados	42
8) Resultados	44
Demográficos y clínicos	44
Genotipificación	44
Haplotipos	50
Proteínas PAD2 y PAD4	51
Exposiciones	55
Análisis de niveles de PAD2 y PAD4 respecto al modelo genético codominante en los grupos AR-NID y AR	57
Análisis de correlación de PAD2 y PAD4 en suero y LBA	66
Análisis de correlación de SNP y proteínas PAD2 y PAD4	66
9) Discusión	70
10) Conclusiones	78
11) Referencias bibliográficas	79
12) Anexos	94
Anexo 1	94
Anexo 2	101

---

---

## Índice de figuras

Figura 1: Mecanismo de reacción catalizado por las enzimas PAD. _____	20
Figura 2: Localización de los genes de las isoformas de las PAD _____	22
Figura 3: Análisis de haplotipos en PADI2 y PADI4 _____	51
Figura 4 Concentración de PAD2 en suero en los grupos de AR-NID, AR y CS _	52
Figura 5: Concentración de PAD4 en suero en los grupos de AR-NID, AR y CS_	52
Figura 6: Niveles de PAD2 en diferentes exposiciones: A-sin exposiciones, HL- humo de leña, Tab-tabaquismo, Z- con más de 2 exposiciones. _____	55
Figura 7: Niveles de PAD4 en diferentes exposiciones: A-sin exposiciones, HL- humo de leña, Tab-tabaquismo, Z- con más de 2 exposiciones. _____	56
Figura 8: PAD2 en genotipos del rs2076615 en los grupos AR-NID y AR _____	58
Figura 9: PAD2 en genotipos del rs1005753 en los grupos AR-NID y AR _____	58
Figura 10: PAD4 en genotipos del rs11203366 en los grupos AR-NID y AR _____	59
Figura 11: PAD4 en genotipos del rs11203367 en los grupos AR-NID y AR _____	59
Figura 12: PAD4 en genotipos del rs1748033 en los grupos AR-NID y AR _____	59
Figura 13: PAD4 en genotipos del rs874881 en los grupos AR-NID y AR _____	59
Figura 14: Análisis de PAD2 en el modelo genético dominante del rs2057094. _	61

---

---

Figura 15: Análisis de PAD2 en el modelo genético dominante del rs2076615	61
Figura 16: Análisis de PAD2 en el modelo genético dominante del rs1005753	61
Figura 17: Análisis de PAD4 en el modelo genético dominante del rs11203366	62
Figura 18: Análisis de PAD4 en el modelo genético dominante del rs11203367	62
Figura 19: Análisis de PAD4 en el modelo genético dominante del rs1748033	62
Figura 20: Análisis de PAD4 en el modelo genético dominante del rs874881	62
Figura 21: Análisis de PAD2 en el modelo genético recesivo del rs2057094	64
Figura 22: Análisis de PAD2 en el modelo genético recesivo del rs2076615	64
Figura 23: Análisis de PAD2 en el modelo genético recesivo del rs1005753	64
Figura 24: Análisis de PAD4 en el modelo genético recesivo del rs11203366	65
Figura 25: Análisis de PAD4 en el modelo genético recesivo del rs11203367	65
Figura 26: Análisis de PAD4 en el modelo genético recesivo del rs1748033	65
Figura 27: Análisis de PAD4 en el modelo genético recesivo del rs874881	65
Figura 28: Gráfico de correlación de PAD2 y PAD4 en suero y LBA con variables clínicas	67
Figura 29 Correlación de FEV1, FVC con un $r^2=0.9$ y un valor de $p=0.0001$	67
Figura 30: Correlación de PAD2 en suero y LBA en los genotipos del rs2057094	68

---

---

Figura 31 Correlación de PAD2 en suero y LBA en los genotipos del rs2076615 68

Figura 32 Correlación de PAD2 en suero y LBA en los genotipos del rs1005753 68

Figura 33: Correlación de PAD4 en suero y LBA en los genotipos del rs11203366  
\_\_\_\_\_ 69

Figura 34: Correlación de PAD4 en suero y LBA en los genotipos del rs11203367.  
\_\_\_\_\_ 69

Figura 35: Correlación de PAD4 en suero y LBA en los genotipos del rs874881. 69

Figura 36: Correlación de PAD4 en suero y LBA en los genotipos del rs1748033.  
\_\_\_\_\_ 69

Figura 37: PAD2 en genotipos del rs2057094 en los grupos AR-NID y AR \_\_\_\_ 101

---

---

## Índice de tablas

Tabla 1: Estudios de asociación de polimorfismos genéticos en genes <i>PADI</i> y <i>AR</i>	29
Tabla 2: Condiciones para llevar a cabo la discriminación alélica mediante qPCR	41
Tabla 3: Características demográficas y clínicas de los grupos de estudio	46
Tabla 4: Equilibrio de Hardy-Weinberg de SNP en <i>PADI2</i> y <i>PADI4</i>	47
Tabla 5: Análisis de genotipos y alelos de SNP en <i>PADI2</i>	48
Tabla 6: Análisis de genotipos y alelos de SNP en <i>PADI4</i>	48
Tabla 7: Análisis del bloque de haplotipo en <i>PADI4</i>	50
Tabla 8: Subgrupo de pacientes e individuos a los que se les realizó la determinación de PAD	54
Tabla 9: Niveles de PAD con diferencia significativa dependiente del genotipo	58
Tabla 10: Análisis de SNP en modelo dominante	60
Tabla 11: Análisis de SNP en modelo recesivo	63



---

---

## **Abreviaturas**

**ACPA:** anticuerpos antipéptidos citrulinados

**Anti-CCP:** anticuerpo contra péptidos cíclicos citrulinados

**ACR:** Colegio Americano de Reumatología

**AR:** artritis reumatoide

**CS:** individuos clínicamente sanos

**CXCL10:** proteína 10 inducible por interferón gamma

**DLCO:** prueba para la capacidad de difusión de monóxido de carbono

**EC:** número asignado por el comité de enzimas

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**EHL:** exposición al humo de leña

**ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima

**EPOC:** enfermedad pulmonar obstructiva crónica

**EULAR:** *European League Against Rheumatism*

**FEV<sub>1</sub>:** Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo

**FR:** factor reumatoide

**FVC:** Capacidad Vital Forzada

---

---

**IEHL:** índice de exposición al humo de leña

**IT:** índice tabáquico

**LBA:** lavado bronquioalveolar

**MAF:** frecuencia del alelo menor

**MMP:** metaloproteinasa de matriz extracelular

**MPT:** modificaciones postraduccionales

**NA:** no aplica

**NID:** neumopatía intersticial difusa

**NINE:** patrón tomográfico de neumopatía intersticial no específico

**NS:** no significativo

**PAD:** peptidil arginina deaminasas

**PADI:** genes que codifican a las isoformas de las enzimas PAD

**PCR:** proteína C reactiva

**RIC:** rango intercuartílico

**SE:** epítipo compartido (*shared epitope*)

**SNP:** polimorfismo de un solo nucleótido

**UIP:** neumonía intersticial usual (NIU)

---

---

## Resumen

Aproximadamente el 80% de individuos con neumopatía intersticial difusa (NID) presenta una enfermedad de origen autoinmune, como la artritis reumatoide (AR), en estas enfermedades se han detectado autoanticuerpos específicos, originados por modificaciones como la citrulinación, la cual es catalizada por las peptidil arginina deiminadas. Hipótesis: polimorfismos en *PADI2* y *PADI4* están asociados al desarrollo de NID en pacientes con AR, y alteración en niveles de PAD2 y PAD4.

Material y métodos: Se incluyeron 127 individuos con AR-NID, 160 AR y 620 individuos clínicamente sanos (CS), se realizó discriminación alélica mediante qPCR de los polimorfismos rs2235926, rs2057094, rs2076615, rs1005753, en *PADI2* y rs11203366, rs11203367, rs874881, rs1748033 en *PADI4*. Se determinó PAD2 y 4 en suero y LBA. Análisis estadístico: prueba exacta de Fisher, U de Mann Whitney, Kruskal Wallis, con corrección por Bonferroni y r de Pearson. Resultados: Se obtuvieron diferencias en *PADI2*: rs1005753 genotipo GT OR=2.07 (p=0.0025). *PADI4*: rs11203366-AA OR=3.08 (p=0.0041), rs874881-GG OR=2.53 (p=0.0032). PAD4 se encuentra incrementada en AR-NID (p<0.001), con el rs11203366-GG, rs11203367-AA, rs1748033-TT y rs874881-CC (p<0.01). Adicionalmente, la proteína PAD2 se encuentra disminuida en individuos del rs1005753-GT (p=0.035).

Conclusión: polimorfismos en *PADI4* se encuentran asociados con susceptibilidad a NID en pacientes con AR, así como con incremento en los niveles de PAD4, en *PADI2* los resultados obtenidos no sugieren cambios en los niveles de las proteínas respecto a los polimorfismos analizados. Palabras clave: neumopatía intersticial difusa, artritis reumatoide, PAD, *PADI2*, *PADI4*.

---

---

## Abstract

About 80.2% of individuals with diffuse interstitial lung disease present a disease of autoimmune origin, in these diseases have detected specific autoantibodies, caused by citrullination, which is catalyzed by peptidyl arginine deiminases. These proteins have been found increased in smokers and associated with protein levels and polymorphisms in the genes that encode them. Hypothesis: polymorphisms in *PADI2* and *PADI4* are associated with the development of NID in patients with RA, and alteration in levels of proteins PAD2 and 4. Material and methods: including 127 individuals AR-NID, 160 AR and 620 CS, allelic discrimination was performed by qPCR of: rs2235926, rs2057094, rs2076615, rs1005753, rs11203366, rs11203367, rs874881, rs1748033. PAD2 and 4 were determined in serum and BAL of a subgroup of individuals. Statistical analysis: Fisher's exact test, Mann Whitney's U, Kruskal Wallis, with Bonferroni's correction and Pearson's r. Results: Differences were obtained in *PADI2*: rs1005753 genotype GT OR=2.07 (p=0.0025). *PADI4*: rs11203366-AA OR=3.08 (p=0.0041), rs874881-GG OR=2.53 (p=0.0032). PAD4 is increased in AR-NID (p<0.001), with rs11203366-GG, rs11203367-AA, rs1748033-TT and rs874881-CC (p<0.01). PAD2 is decreased in individuals of rs1005753-GT (p=0.035). Conclusion: polymorphisms in *PADI4* are associated with NID susceptibility in patients with RA, as well as with increased levels of PAD4, in *PADI2*, results, no changes in levels, proteins, polymorphisms analyzed. Key words: interstitial lung disease, rheumatoid arthritis, PAD, *PADI2*, *PADI4*.

---

---

## 1) Introducción

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria sistémica, autoinmune y progresiva; aproximadamente 50% de los pacientes desarrollan alguna manifestación extraarticular, siendo el pulmón un sitio frecuente de afectación, la cual ocurre hasta en 67% de los pacientes con AR, aunque solo el 10% que desarrolla una neumopatía intersticial difusa (NID) es diagnosticado clínicamente.

Se han detectado autoanticuerpos específicos como anticuerpos antipéptidos citrulinados (ACPA), la citrulinación es una modificación postraducciona catalizada por enzimas peptidil arginina deiminasa (PAD), las cuales pueden modificar la estructura de proteínas, aumentando el reconocimiento por ACPA, se han encontrado proteínas citrulinadas incrementadas en lavado broncoalveolar de fumadores en comparación con no fumadores, esto asociado con los niveles de PAD2 y PAD4 que también se han descrito presentes en mucosa bronquial y biopsias de fumadores.

La citrulinación de proteínas se lleva a cabo por una gran familia de enzimas denominadas peptidil arginina deiminasa (PAD), las cuales realizan esta modificación en diversas proteínas, teniendo funciones específicas en mecanismos tanto fisiológicos como patológicos, desde la diferenciación de queratinocitos hasta la participación en vías de señalización y/o regulación de estrógenos, entre otros.

Por otro lado, la generación de anticuerpos contra diferentes blancos, teniendo como principales blancos la filagrina, vimentina y colágeno, los cuales al ser

---

---

citrulinados desarrollan una respuesta inmunológica que desencadena un proceso inflamatorio permanente, comunes en enfermedades autoinmunes y crónicas.

También se han observado cambios a nivel génico en los genes que codifican para dichas proteínas (*PADI1* - *PADI4* y *PADI6*) en donde variantes, específicamente tipo SNP, tienen un rol importante en el plegamiento, actividad, función y vida media de las PAD.

Explorar las vías por las cuales se generan mecanismos patológicos relacionados a las PAD conducirá a elucidar nuevos blancos terapéuticos, desarrollo de fármacos preventivos, medidas diagnósticas menos costosas, específicas y sensibles.

## 2) Marco teórico

### **Neumopatía intersticial difusa (NID)**

La neumopatía intersticial difusa (NID) agrupa un gran número de padecimientos respiratorios subagudos y crónicos que se caracterizan por comprometer al parénquima pulmonar, afectando primordialmente al intersticio y a los espacios alveolares. <sup>1-4</sup>

Dentro de la clasificación de las NID se encuentran las primarias como la fibrosis pulmonar idiopática y secundarias: a agentes agresores (de riesgo) conocidos, o enfermedades de etiología desconocida como son las enfermedades colágeno-vasculares entre las cuales se encuentra la artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, entre otras.

Se ha considerado que estas NID afectan durante la inflamación y en el proceso de fibrosis al intersticio del parénquima pulmonar. <sup>1-5</sup> La lesión pulmonar de la enfermedad vascular del colágeno puede afectar distintas partes del pulmón, tales como la pleura, alveolos, el intersticio, vasos, tejido linfático y las vías respiratorias grandes y pequeñas. <sup>6</sup>

Se ha reportado que cerca del 3% de enfermedades pulmonares intersticiales son de causa como la asbestosis, o exposiciones crónicas, las cuales no se pueden clasificar dentro de los grupos que ya se han descrito. <sup>7</sup>

El diagnóstico de las enfermedades pulmonares intersticiales es en mayor parte realizado mediante características de imagen (radiográficas y tomográficas) a partir

---

---

del cual se obtienen “patrones”, otra prueba que se realiza a los pacientes con sospecha de enfermedad pulmonar intersticial es biopsia pulmonar, procedimiento considerado como invasivo para los individuos, y desfavorable en individuos de edad avanzada debido al aumento en el riesgo a comorbilidades. Así como pruebas serológicas en enfermedades que son de fondo autoinmune relacionadas con enfermedades colágeno-vasculares.<sup>7</sup>

En el caso de la neumopatía intersticial no específica (NINE) se realiza determinación de anticuerpos en suero, así como marcadores de inflamación sistémica (proteína C reactiva, velocidad de sedimentación globular), anticuerpos antinucleares y factor reumatoide, entre otros autoanticuerpos y marcadores séricos.<sup>8</sup>

Por otro lado, la prueba de caminata de 6 minutos (C6M) se realiza para medir el grado de hipoxemia, se evalúa el efecto de la edad, así como la severidad de las enfermedades, sin embargo, en distintos estudios no se han observado diferencias posteriores a un seguimiento en individuos (seguimiento a 1 año), la cual se ha demostrado útil para evaluar evolución y pronóstico de las enfermedades pulmonares intersticiales.<sup>7,8</sup>

Las enfermedades pulmonares intersticiales más frecuentes son: la fibrosis pulmonar idiopática, sarcoidosis, neumonía organizada criptogénica, y las asociadas a enfermedades del colágeno, así como la neumonitis por hipersensibilidad.



---

---

Se reporta que la edad de diagnóstico en las neumopatías intersticiales asociadas a enfermedades del colágeno es de los 20 a los 40 años, de las cuales son más frecuentes en mujeres la neumonía intersticial descamativa y la bronquiolitis asociada a enfermedad pulmonar.<sup>8</sup>

Las principales manifestaciones clínicas presentes en los individuos son la disnea al esfuerzo y tos, sin embargo, hay individuos que se han reportado como asintomáticos, otros síntomas presentes en los individuos con NID se asocian con las manifestaciones extrapulmonares.

Se ha reportado que pacientes con neumonía intersticial asociada con enfermedades colágeno-vasculares tienen un mejor pronóstico que los individuos con neumonía intersticial idiopática.<sup>9-11</sup>

---

---

## Artritis Reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica caracterizada por inflamación simétrica de las articulaciones sinoviales periféricas, progresiva y de causa desconocida.<sup>12</sup> En un estudio epidemiológico en México se reportó una prevalencia de AR del 1.6%.<sup>13</sup>

Se han descrito distintos factores de riesgo:

- Genéticos: *HLA-DRB1*<sup>14,15</sup>, *PTPN22*<sup>16</sup>, *TRAF1*, *TNF*, *PADI4*.<sup>17</sup>
- Ambientales: tabaquismo<sup>18</sup>, microbioma pulmonar<sup>19,20</sup>, periodontitis<sup>21,22</sup>, entre otros.
- Sexo femenino: se ha descrito el rol de los estrógenos en el desarrollo de distintas enfermedades.<sup>23,24</sup>

En fluido sinovial y suero de pacientes con AR se ha encontrado alta concentración de autoanticuerpos<sup>25-27</sup> contra diferentes blancos biológicos, por ejemplo, colágeno tipo II, vimentina, filagrina, proteínas de choque térmico, entre otras; además de autoanticuerpos altamente específicos, como anticuerpos antipeptidos citrulinados (ACPA).<sup>25, 28-30</sup>

Estos últimos tienen una sensibilidad >80% y especificidad del 98% en pacientes con AR. Además se presentan en etapas tempranas de la enfermedad, facilitando su diagnóstico,<sup>28</sup> ya que reconocen epítopes que contienen peptidil citrulina.

---

---

A pesar de que los procesos inflamatorios son muy frecuentes en la vida diaria, sólo una pequeña proporción de la población desarrolla ACPA, que son altamente específicos de la AR y se relacionan con la patogenia de la artritis reumatoide.<sup>13</sup>

Las enzimas peptidil arginina deiminadas tienen una alta especificidad debida a su actividad catalítica en la conversión de arginina a citrulina, la cual puede promover la generación de epítopes específicos a los ACPA.<sup>34</sup> La citrulinación puede modificar la estructura de las proteínas, aumentando el reconocimiento por autoanticuerpos humanos.<sup>35</sup>

Se ha descrito la participación de los anticuerpos en la actividad de la AR, en donde cerca de 53% de pacientes con anticuerpos anti-PAD3/4 tienen un índice bajo de actividad de la enfermedad (CDAI: *clinical disease activity index*) en el tiempo de la examinación clínica, estos en comparación de los individuos con anticuerpos negativos, adicionalmente, individuos con anti-CCP positivos tienen una media de duración de la enfermedad de 9.5 años más que los anti-CCP negativos. Y la presencia de uno o más alelos del SE HLA-DRB1 se ve relacionado con anticuerpos anti-PAD4 positivos.<sup>36</sup>

---

---

## Tabaquismo como factor de riesgo

El tabaquismo juega un papel importante en el desarrollo de distintas enfermedades, es uno de los principales factores de riesgo ambiental que predispone a artritis reumatoide y enfermedades pulmonares (entre otras enfermedades).

La citrulinación causada por el humo de tabaco es considerada como un mecanismo por el cual se inducen o desarrollan enfermedades autoinmunes o inflamatorias, este efecto conlleva a la relación de la presencia de la citrulinación de proteínas reflejada en los niveles de ACPA en sangre, <sup>18,37</sup> los cuales se han encontrado incrementados en grupos de fumadores, en comparación con no fumadores.<sup>37</sup>

Se ha observado que existe correlación entre la presencia del alelo HLA-DRB1\*04:01 con ACPA en individuos fumadores que tienen AR. El riesgo relativo de desarrollar AR y la presencia de ACPA positivos es 20 veces mayor para los pacientes fumadores con el alelo HLA-DRB1\*04:01 en comparación con los individuos no fumadores sin el alelo, lo que nos indica el impacto del tabaquismo adicional a la genética en la población en general. <sup>33,32</sup>

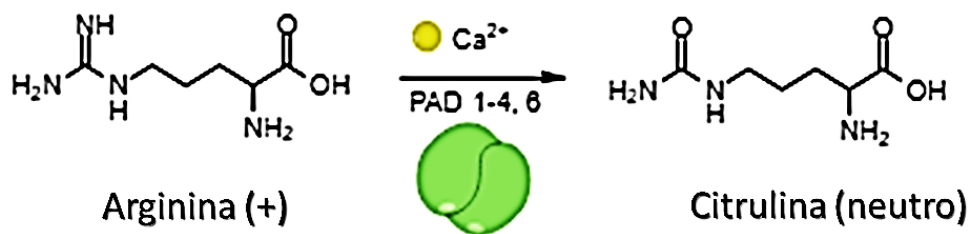
En población japonesa se reportó un incremento en el riesgo de desarrollar AR en hombres que fumaban con el alelo T del rs11203367 con un OR=1.61 (p=0.0003) y con el rs1748033-T OR=1.46 (p=0.005).<sup>38</sup>

## Peptidil arginina deiminasas (PAD)

Las modificaciones postraduccionales (MPT) son procesos críticos en la biología celular, incluyen la expresión génica, actividad enzimática, y la estabilidad de las proteínas. Entre estas MPT se encuentran la fosforilación, acetilación, metilación y citrulinación, esta última se encuentra catalizada por una familia de enzimas dependientes de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), llamadas peptidil arginina deiminasas (PAD; EC 3.5.3.15).<sup>39,40</sup>

Las PAD regulan un gran número de actividades en procesos celulares fundamentales, en los mamíferos se han descrito 5 isoenzimas específicamente en humanos: PAD1-4 y PAD6, cada una con una distribución característica en tejidos y órganos,<sup>39,28</sup> las cuales tienen de 70-95% de identidad en su secuencia de aminoácidos.<sup>31</sup>

La citrulinación de proteínas por las enzimas PAD se lleva a cabo mediante la hidrólisis del enlace guanidinio en la peptidil arginina, dando como resultado una peptidil citrulina y amonio, con un largo grupo de modificaciones guanidinio, estas enzimas dan como resultado a una gran familia, denominadas amidinotransferasas (se muestra el mecanismo en la figura 1).<sup>35</sup>



*Figura 1: Mecanismo de reacción catalizado por las enzimas PAD.*

---

---

La neutralización de la carga positiva del grupo guanidinio se encuentra reemplazado por urea neutral, disminuyendo el  $pK_a$  de la cisteína nucleofílica en PAD2, en comparación con el mecanismo de protonación reversa de las PAD1, 3 y 4, estas diferencias son las que hacen que las isoenzimas desarrollen inhibidores específicos.<sup>39</sup>

A nivel proteico, la reacción provoca reducción en la masa molecular de aproximadamente 1.0 Da por cada arginina modificada, perdiendo su carga positiva;<sup>31,41</sup> el punto isoeléctrico proporcionado por el enlace al hidrógeno, el cual le proporciona la habilidad de interactuar con otras proteínas.<sup>40,42,43</sup>

La carga neta negativa se cree que es el instrumento de reconocimiento de la carga positiva del sustrato de los residuos de arginina, así como la unión de iones esenciales de calcio.<sup>42</sup>

Como se mencionó anteriormente, la función biológica que llevan a cabo en el ser humano depende del sitio en donde se expresan, así como de su sustrato. Algunas de las funciones que llevan a cabo las isoenzimas PAD y su distribución en tejidos y órganos humanos son: la citrulinación de queratina, una de las funciones mejor descritas, esencial en el proceso de cornificación en la epidermis, en este interviene la isoenzima PAD1.<sup>44</sup>

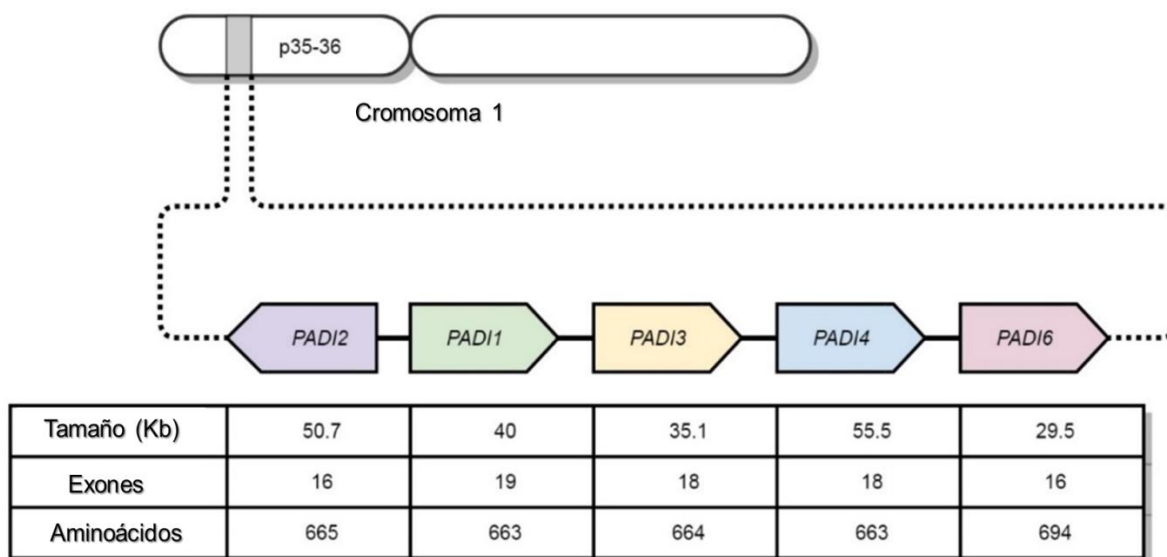
En el sistema nervioso central la presencia de PAD2 interviene en la señalización de astrocitos; PAD3 interviene en la disminución de habilidad regenerativa, mientras que PAD4 presente en el núcleo celular, interviene en procesos como la citrulinación

de histonas, mediando su descondensación, en la regulación génica y formación de trampas extracelulares de neutrófilos.<sup>45-47</sup>

Finalmente, PAD6 participa en el crecimiento y formación de oocitos, en la regulación de la posición y el movimiento de factores críticos como los microtúbulos.<sup>48</sup>

### Localización y estructura génica de las PAD

Los genes que codifican a las enzimas PAD se encuentran localizados en el brazo corto del cromosoma 1, en la región p35-36 con aproximadamente 355Kb.<sup>29,49</sup> Como se muestra en la figura 2 cada isoenzima tiene una longitud génica diferente.



**Figura 2: Localización de los genes de las isoformas de las PAD**

Existen descritas variantes genéticas de los genes PAD, tanto en las regiones codificantes (exones) como en no codificantes (intrones), entre otras, dentro de las

---

---

cuales se encuentran polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), inserciones, deleciones, etc.<sup>46,50,51</sup>

De acuerdo con la base de datos Ensembl, existen diferentes polimorfismos de tipo SNP dentro de los genes *PADI* que codifican a las isoenzimas PAD, en donde se observa que aproximadamente el 90% de las variantes presentes en los genes son tipo SNP y entre ellos más del 55% son SNP reguladores/ estructurales (rSNP/ srSNP, por sus siglas en inglés), y solo del 3-8% son SNP codificantes (cSNP).

Estas variantes independientemente de la localización pueden dar un cambio en la proteína, modificando su función, estructura, carga o afinidad por los sustratos.

Dentro de los SNP se encuentran los polimorfismos reguladores (rSNP, presentes en región promotora), estructurales (srSNP, mRNA primarios y secundarios, regiones 3'UTR y 5'UTR, entre otras) y codificantes (cSNP, se encuentran en exones, se dividen en sinónimos y no sinónimos).<sup>52</sup>

Más del 88% son polimorfismos en genes *PADI1-4* y *PADI6* son tipo SNP, de los cuales cerca del 50% se encuentran en regiones intrónicas, y menos del 5% se encuentran localizados en regiones codificantes, a excepción de *PADI3* la cual tiene cerca del 8% de variantes tipo cSNP.

En diferentes poblaciones se han llevado a cabo estudios de asociación en los genes *PADI* relacionados con la AR, estos estudios se han realizado mayormente en población asiática, sin embargo, las asociaciones a susceptibilidad a AR en genes *PADI* están descritos en diferentes poblaciones.



---

---

## Participación de las PAD en patología

La citrulinación causa cambios en la estructura y/o función de sus blancos biológicos (modificación irreversible), tales como la pérdida de la carga positiva, cambios conformacionales, alteraciones en la afinidad a proteasas o proteínas de interacción, entre otras.<sup>48</sup> La conversión de arginina en citrulina es capaz de activar la respuesta inmune, dicha conversión da como resultado un cambio en la carga de los aminoácidos.

En los procesos inflamatorios, cuando las células mueren por necrosis, se rompe la membrana celular y se liberan las PAD al espacio extracelular, donde existen elevadas concentraciones de  $Ca^{2+}$  que activan las PAD y entonces son capaces de citrulinar a diferentes proteínas.<sup>31</sup>

El estudio de la citrulinación de proteínas ha adquirido gran interés debido a su participación en procesos tanto fisiológicos como patológicos; en los procesos patológicos las proteínas citrulinadas se han relacionado con el progreso de enfermedades crónicas o autoinmunes, tales como la artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM), Alzheimer, diferentes tipos de cáncer, entre otras.<sup>28,39, 43</sup>

Se ha reportado que la citrulinación se lleva a cabo tanto en condiciones extremas como la apoptosis, y en condiciones fisiológicas como la diferenciación de la epidermis.<sup>49</sup>

La mayoría de las PAD se encuentra en el citosol, pero son inactivas debido a la baja concentración de  $Ca^{+2}$ .<sup>31</sup> Durante la muerte celular programada la

---

---

concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  es alta, dando como resultado la máxima actividad de las PAD, lo que hace que la citrulinación sea inespecífica, reduciendo las cargas positivas y la estabilidad del nucleosoma.<sup>47</sup>

Los sustratos mejor descritos de las PAD son: estradiol, queratina, filagrina, vimentina, proteína básica de mielina, fibrinógeno, quimiocinas, histonas, entre otros.<sup>41,53</sup>

La producción de nuevos epítomos citrulinados en el espacio extracelular hace que sean accesibles al sistema inmunológico, y de esta manera se puede iniciar una respuesta, modificando tanto la función como la vida media de las proteínas citrulinadas.<sup>54</sup>

La regulación de las PAD a nivel proteína se ha descrito de la siguiente manera: el ion  $\text{Ca}^{2+}$  es uno de los reguladores de la actividad más importantes. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel intracelular es mínima, dando como resultado que PAD4 sea inactiva, el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  (derivado de la apoptosis, estrés oxidativo) altera la concentración intracelular, provocando que la enzima se vuelva activa.<sup>55,44</sup> Además de la regulación de la actividad de las PAD por medio del pH de cada isoenzima.<sup>56,57</sup>

---

---

## **Citrulinación de proteínas en pacientes con neumopatía intersticial difusa y artritis reumatoide**

Se han propuesto diferentes mecanismos que explican el desarrollo de autoanticuerpos y la respuesta a antígenos, uno de ellos es el propuesto por Paulin y colaboradores, en donde proponen dos vías en relación con los patrones encontrados, en la primera vía, una respuesta inmune contra péptidos citrulinados tiene lugar en las articulaciones, se desplaza posteriormente a los pulmones, lo que resulta en la inflamación pulmonar intersticial.<sup>11</sup>

En la segunda vía, los individuos con neumonía intersticial usual (UIP) y con “cierta” susceptibilidad genética a AR originan una respuesta inmune contra péptidos citrulinados en el pulmón, lo cual inicia un proceso inflamatorio que afecta secundariamente las articulaciones.<sup>11, 58</sup> Sin embargo, Harlow y colaboradores, sugieren que el desarrollo de autoanticuerpos contra proteínas citrulinadas inicia en los pulmones y posteriormente se perpetua en tejidos extra pulmonares.<sup>59</sup>

Los ACPA se han asociado fuertemente con tabaquismo y la presencia del epítipo compartido, vimentina citrulinada y péptido 1  $\alpha$ -enolasa, esto sugiere que la enolasa y vimentina citrulinada en el pulmón pueden desencadenar una respuesta autoinmune, incrementando la formación de péptidos citrulinados derivando en la respuesta de los ACPA.<sup>60</sup>

En un grupo de individuos con EPOC secundaria a tabaquismo, Lugli y colaboradores identificaron a PAD2 y PAD4, con sus respectivos sustratos (vimentina y fibrinógeno) además de  $\alpha$ -enolasa en pulmón, nodos linfáticos, bazo y

---

---

musculo esquelético, sin embargo, no existe diferencia estadísticamente significativa en los niveles encontrados de las enzimas PAD. <sup>60</sup>

Por otro lado, proteínas citrulinadas están incrementadas en lavado broncoalveolar de fumadores en comparación con no fumadores, este incremento está asociado con el incremento de los niveles de expresión de PAD2, estos niveles de proteínas citrulinadas están presentes en mucosa bronquial y biopsias de fumadores, este estudio demuestra que fumar incrementa la expresión de PAD2 en mucosa bronquial y compartimentos alveolares, con una posterior generación de proteínas citrulinadas. <sup>32,61,62</sup>

Shelef y colaboradores reportan la participación de PAD4 la cual puede contribuir junto con TNF $\alpha$  en la amplificación de la producción de ACPA, lo que sugiere que se tiene una regulación positiva compleja la cual implica la participación de PAD4, antígenos citrulinados, ACPA y TNF $\alpha$  en la exacerbación de la AR. <sup>63</sup>

La presencia de anticuerpos anti-PAD4 y anti-CCP en el periodo preclínico, en donde observaron que anti-PAD4 en periodos prediagnóstico pueden ser bajos pero sus niveles incrementan con el tiempo. <sup>64</sup>

---

---

## **Estudios de asociación de SNP en genes *PADI***

Existen diferentes SNP asociados a la susceptibilidad o menor riesgo a padecer enfermedades, dentro de los cuales *PADI3* no se ha encontrado asociado en cambios a nivel génico con enfermedades, sin embargo, se han descrito variantes en ciertas condiciones como en el síndrome del cabello impeinable,<sup>65</sup> mientras que *PADI4* ha sido estudiada en diferentes poblaciones en donde se ha encontrado asociada mayormente en población asiática a la susceptibilidad a desarrollar enfermedades autoinmunes, como AR, o a menor riesgo a desarrollar tuberculosis en *PADI\_89*.<sup>66</sup>

Se muestran en la tabla 1 estudios que se han realizado en distintas poblaciones donde polimorfismos tipo SNP en los genes *PADI2* y *PADI4* se encuentran asociados con un cambio en la expresión de PAD4 y con susceptibilidad a artritis reumatoide, se observa que estos hallazgos se han replicado en poblaciones asiáticas y caucásicas en su mayoría.

**Tabla 1: Estudios de asociación de polimorfismos genéticos en genes PADI y artritis reumatoide.**

<b>Gene/SNP</b>	<b>País (estudio)<sup>Ref</sup></b>	<b>n (casos/controles)</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC 95%)</b>	<b>Hallazgo</b>
<b>PADI2</b>					
rs2235926, rs2057094	Norte de China <sup>67</sup>	1140 (267 AR/ 51 AS/160 control)	8.39E-04, 3.2E-03	1.70 (1.57–1.86), 1.36 (1.06–1.86)	Asociados con AR
rs1005753	Malasia/ MyEIRA <sup>50</sup>	2809 (1,238/1,571)	4.00E-02, 3.29E-03	0.87 (0.77- 0.99)	rs1005753 asociado a AR.
<b>PADI4</b>					
_89-105	Japón <sup>68</sup>	1566 (830/736)	8.40E-06- 5.10E-04	1.66-2.0	<i>PADI4</i> 92, 94, 95, 97, 99, 100, 101 y 104 asociados con AR.
_89, 90, 92, 104	Reino Unido <sup>69</sup>	1320 (839/481)	NS		Haplotipo de susceptibilidad a AR sin significancia estadística.
_92, 94, 97, 99, 100, 103 y 104	Inglaterra <sup>70</sup>	222 (111/111)	3.00E-02		Haplotipo <i>PADI4</i> _100/ <i>PADI4</i> _103. Incremento de la expresión de mRNA de <i>PADI4</i> en PBM de pacientes con AR.
_94, 102 y 104	Japón <sup>71</sup>	2096 (1170/926)	8.00E-04	1.21-1.36	SNP con asociación a AR.
_94	Suecia, EE.UU.(EIRA, NARAC) <sup>17</sup>	4127 (2370AR/1757 control)	2.00E-02	1.1 (1.10-1.21)	17 alelos de 14 genes, <i>PADI4</i> _94 asociado con AR.
_89, 90, 92 y 104	Corea <sup>72</sup>	937 (545/392)	1.00E-04	1.5 (1.2-1.8)	Haplotipo GTGT fuertemente asociado con susceptibilidad a AR.

*EIRA*= Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis, *MyEIRA*= Malaysian Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis, *AS*= espondilitis anquilosante, *TB*= tuberculosis, *AR*= artritis reumatoide, *EZ*= esquizofrenia, *OR*= odds ratio, *IC95%*= intervalo de confianza 95%. *PBM*= monocitos de sangre periférica. *NARAC*= North American Rheumatoid Arthritis Consortium, *NS*=  $p \geq 0.05$ .

Continuación de Tabla 1: Estudios de asociación de polimorfismos genéticos en genes PADI y artritis reumatoide.

_89, 90, 92, 94, 95, 96 y 104	Alemania <sup>73</sup>	204 (102/102)	4.00E-02	1.6 (1.1-2.3)	<i>PADI4</i> 89, 90, and 94 asociación a AR.
_89 y 90	Francia <sup>74</sup>	680 (405/275)	3.00E-2, 2.00E-3		Asociado con susceptibilidad a AR
_104	Irán <sup>75</sup>	300 (150/150)	6.00E-03	1.63 (1.16-2.29)	alelo T asociado con AR.
_89, 90, 92 y 104	Irán <sup>76</sup>	196 (101 AS/95 AR/ controles)	8.00E-04	2.27 (1.28-4.011)	Asociación de <i>PADI4</i> _104 con AR
_104	Japón/Alemania <sup>38</sup>	2952 (1019/907) / (635/391)	4.70E-02	1.46 (1.12-1.90)	Predispone fumadores (hombres) a desarrollo de AR
_89, 90 y 92	México <sup>77</sup>	184 (86/98)	4.00E-02, 4.00E-03	2.51 (1.19-5.32), 2.64 (1.21-5.75)	<i>PADI4</i> _89 y 90, haplotipo GTG (OR=18.9 [2.4-146.8]), GTC (OR=2.4 [1.3-4.4]) susceptibilidad a AR.
_89, 90 y 104	Corea <sup>66</sup>	215 (47TB/35 sin TB/50 AR/83 control)	2.00E-02	0.35	<i>PADI4</i> _89 asociado a protección en pacientes con AR a TB.
_94, 102 y 104	Japón <sup>78</sup>	1093 (534 EZ/559 control)	4.70E-02		8 SNP evaluados, <i>PADI4</i> _94 asociado a susceptibilidad de AR, sin contribución a EZ.

EIRA= *Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis*, MyEIRA= *Malaysian Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis*, AS= espondilitis anquilosante, TB= tuberculosis, AR= artritis reumatoide, EZ= esquizofrenia, OR= *odds ratio*, IC95%= intervalo de confianza 95%. PBM= monocitos de sangre periférica. NARAC= *North American Rheumatoid Arthritis Consortium*, NS=  $p \geq 0.05$ .

### 3) Planteamiento del problema

La artritis reumatoide se caracteriza por inflamación de las articulaciones sinoviales periféricas, manifestaciones articulares y extraarticulares; el pulmón es comúnmente un sitio de enfermedad extra-articular, las manifestaciones pulmonares varían y pueden incluir vías aéreas, parénquima, enfermedad pleural y/o vascular, estas suelen ser posteriores al desarrollo de la enfermedad articular, pero en algunos casos el involucramiento pulmonar es la primera manifestación de la AR.<sup>79</sup>

La AR es la enfermedad más común de tejido conectivo, con una prevalencia de 0.5% a 2% en la población general.<sup>80</sup> La enfermedad extraarticular se produce en aproximadamente el 50% de los pacientes, siendo el pulmón uno de los órganos blanco de más frecuente de afectación. El compromiso del pulmón puede ocurrir en hasta el 67% de los pacientes, aunque algunos informes indican una incidencia más baja (10%-20%).<sup>81-83</sup>

La citrulinación es una modificación postraducciona catalizada por una familia de enzimas llamadas peptidil arginina deiminasa (PAD), las cuales pueden modificar la estructura de proteínas, aumentando el reconocimiento por autoanticuerpos humanos ACPA.<sup>5,35,84</sup> Se han identificado autoanticuerpos séricos contra múltiples proteínas y péptidos citrulinados incluyendo fibrinógeno, vimentina, e isoformas citrulinadas de proteína de choque térmico 90, metaloproteinasa de matriz extracelular 7 (MMP-7) y la proteína 10 inducible por interferón-gamma (CXCL10).<sup>85</sup>



---

---

Los miembros de la familia de genes peptidil arginina deiminadas (PAD, [*PADI1*-*PADI4* y *PADI6*]), generan péptidos citrulinados reconocidos por los anticuerpos anti-CCP<sup>86</sup> a través de la modificación postraduccional de residuos de arginina a citrulina.<sup>31,87</sup>

El tabaco juega un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad, es uno de los factores de riesgo ambiental principales que predispone a artritis reumatoide (y otras enfermedades), la citrulinación causada por el humo de tabaco es considerada como un mecanismo por el cual se inducen o desarrollan enfermedades autoinmunes o inflamatorias, este efecto conlleva a la relación de la citrulinación de proteínas reflejada en los niveles de ACPA en sangre.<sup>18,37,60</sup>

En fluido sinovial y suero de pacientes con AR se ha encontrado alta concentración de autoanticuerpos contra diferentes blancos biológicos, como, colágeno tipo II, vimentina, filagrina, proteínas de choque térmico, además de autoanticuerpos altamente específicos, como anticuerpos antipéptidos citrulinados (ACPA).<sup>25,28-30,88,89</sup>

Proteínas citrulinadas se han encontrado incrementadas en lavado bronquioalveolar (LBA) de fumadores en comparación con no fumadores, el incremento está asociado con los niveles de expresión de PAD2 y PAD4, también presentes en mucosa bronquial y biopsias de fumadores.<sup>32</sup>

Varios SNP y haplotipos relacionados en *PADI4* se han asociado con la susceptibilidad a AR en estudios independientes de Japón, Corea, EE. UU. y Alemania.<sup>84</sup> Sin embargo, no existen estudios que evalúen de manera global e

---

---

integral la participación de factores genéticos involucrados en la susceptibilidad genética y farmacogenómica de AR en el desarrollo de NID. Las bases fisiopatológicas para el desarrollo de neumopatía intersticial difusa (NID) en pacientes con AR siguen siendo poco claras. Los datos disponibles sugieren cierto papel de factores ambientales y genéticos.

#### 4) Justificación

La artritis reumatoide constituye un problema de salud a nivel mundial, en México se estima que tiene una prevalencia del 1.6%, genera diferentes grados de discapacidad, lo que impacta en la economía y calidad de vida de los pacientes y sus familiares. A pesar de que los procesos inflamatorios son muy frecuentes en la vida diaria, sólo una pequeña proporción de la población desarrolla ACPA, que son altamente específicos de la AR y se relacionan con la patogenia de la AR. De los individuos con AR, solo el 10% que desarrolla una neumopatía intersticial es diagnosticado, las tasas de mortalidad de AR asociadas a NID incrementan aproximadamente el 28% en mujeres.

El tabaquismo es un factor ambiental que puede conducir a la autoinmunidad en sujetos genéticamente susceptibles (presencia de alelos HLA-DR, así como polimorfismos tipo SNP en diferentes genes), incrementando la expresión de citocinas de respuesta a estímulos ambientales en mucosa bronquial y compartimentos alveolares, con una posterior generación de proteínas citrulinadas y autoanticuerpos.

Actualmente existen múltiples estudios que han evaluado por distintas metodologías la asociación genética entre polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y su participación en el desarrollo de la artritis reumatoide (AR), sin embargo, no existen investigaciones respecto a los factores genéticos involucrados en el desarrollo de una Neumopatía Intersticial Difusa (NID) como manifestación extraarticular de AR.

---

---

5) Hipótesis

Existen polimorfismos en *PADI2* y *PADI4* asociados al desarrollo de neumopatía intersticial difusa en pacientes con artritis reumatoide, y alteración en los niveles de PAD2 y PAD4.

6) Objetivos

Objetivo general

Identificar la relación entre polimorfismos en *PADI2* y *PADI4* en el desarrollo de neumopatía intersticial difusa en pacientes con artritis reumatoide.

Objetivos específicos

Identificar polimorfismos presentes en *PADI2* y *PADI4* asociados al desarrollo de NID en pacientes con AR.

Determinar las concentraciones de PAD2 y PAD4 en muestras de lavado bronquioalveolar y suero.

Correlacionar concentraciones de PAD2 y PAD4 con polimorfismos en dichas enzimas.

## 7) Materiales y métodos

Estudio transversal, retrospectivo.

### **Cálculo del tamaño de muestra**

El cálculo de tamaño de muestra para el estudio se realizó utilizando el programa

Epi Info v7.0 tomando los siguientes parámetros:

- Prevalencia de la enfermedad = 0.11
- Un intervalo de confianza al 95%
- Poder estadístico del 85%
- Se seleccionaron 1 caso y 2 controles
- Frecuencia del alelo menor reportado en población mexicana (MAF)= 25%
- Se tomó un *Odds ratio* de 2.0

Se obtuvo una n de 193 individuos con neumopatía intersticial difusa y artritis reumatoide.

200 individuos con artritis reumatoide.

Así como 3 individuos clínicamente sanos por cada individuo con la enfermedad, con una n= 600.

### **Consideraciones éticas**

Previo a la realización de la toma de muestra sanguínea, además del llenado del cuestionario se explicó a los individuos participantes en el estudio sobre: los objetivos, riesgos, beneficios y propósitos de este protocolo de investigación,

---

---

haciendo hincapié que el estudio pretende conocer la frecuencia de variaciones genéticas humanas asociadas a NID en pacientes con AR, y que los resultados que esta genere contribuirán al conocimiento y manejo de este padecimiento de incidencia mundial. Se indicó textualmente que la aceptación en el estudio puede ser retirada en cualquier momento por el sujeto de estudio sin detrimento o perjuicio alguno. Se proporcionó un documento a cada uno de los participantes por medio del cual el INER avala que los datos personales serán protegidos, totalmente confidenciales, incorporados y tratados en el sistema de datos personales denominado Bases de Datos de los Protocolos de Investigación con fundamento en la Ley General de Salud en Materia de Investigación. Los cuales están autorizados mediante firma autógrafa por el paciente para la realización de este protocolo de investigación (Protocolo B20-15, Anexo 1).

### **Grupos de estudio**

Los individuos fueron evaluados por médicos especialistas en neumología y reumatología, autorreferidos como mestizos mexicanos por tres generaciones y no relacionados biológicamente.

Previamente fueron informados y firmaron cartas de consentimiento Informado y de privacidad de datos personales, aprobados por el comité de ciencia y bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias INER (Protocolo B20-15, Anexo 1).

En el primer grupo se incluyeron pacientes con artritis reumatoide y enfermedad pulmonar intersticial difusa (AR-NID), a los pacientes se realizaron pruebas de

---

---

función pulmonar: espirometría y DL<sub>CO</sub>, así como radiografía y tomografía de tórax en donde se obtuvo la evidencia de enfermedad intersticial, fueron realizadas en el servicio clínico de enfermedades Intersticiales y Reumatología del INER.

El segundo grupo se incluyeron pacientes con artritis reumatoide (AR), evaluados por especialistas en reumatología de acuerdo con criterios ACR/EULAR, se realizaron pruebas de función pulmonar, en donde observaron que no había evidencia de restricción/ alteración pulmonar. Reclutados del servicio de reumatología del Hospital General Manuel Gea González y de Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

El tercer grupo incluye individuos clínicamente sanos (CS), los cuales son donadores de sangre, sin enfermedades pulmonares ni reumatológicas. Obtenidas del Biobanco del laboratorio HLA INER y del banco de sangre del INER.

Dentro del grupo de voluntarios sanos, se incluyó un subgrupo de individuos con exposición a tabaquismo, los cuales fueron seleccionados de acuerdo con edad, sexo e índice de exposición a tabaquismo de los individuos en los grupos de pacientes con AR y AR-NID.

### **Criterios de inclusión**

- Individuos mayores de 18 años.
- Sexo indistinto
- Individuos con artritis reumatoide
- Individuos con artritis reumatoide y neumopatía intersticial difusa

---

---

### **Criterios de exclusión**

- Pacientes con enfermedades autoinmunes diferentes a AR.
- Pacientes con enfermedades pulmonares obstructivas y enfermedades crónicas o degenerativas.

### **Criterios de eliminación**

- Individuos con muestra insuficiente de material biológico
- Solicitud del paciente/voluntario para retirarse del protocolo.

### **Obtención de muestras biológicas:**

Se realizó una toma de muestra sanguínea por punción de la vena del antebrazo empleando el sistema de vacío vacutainer y tubos con anticoagulante (EDTA) para la obtención de DNA y un tubo con gel activador del coágulo para la obtención de suero.

### **Extracción de DNA**

El DNA se obtuvo de leucocitos mediante el kit comercial *BDtrack Genomic DNA Isolation (Maxim Biotech, CA, USA)*. Se centrifugaron las muestras a 3500 rpm durante 5 minutos para la obtención de plasma posteriormente se extrajo la capa de leucocitos del tubo con EDTA, se colocó en un tubo cónico de 15 mL agregando 2 mL de solución BD1, se llevó a cabo una homogenización mediante agitación y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se eliminó el sobrenadante del tubo y se agregaron 2 mL de BD2 agitando y centrifugando a 3000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante del tubo y se agregó 1 mL de BD3, se



---

---

homogenizó el botón leucocitario formado, se incubó en baño maría por 12 horas a 65°C.

Posteriormente se transfirió la muestra obtenida a un microtubo y se agregaron 400 µL de BD4, se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se decantó el sobrenadante en un nuevo microtubo y se agregaron 500 µL de isopropanol absoluto, se mezcló por inversión y se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos. Se decantó el isopropanol protegiendo el DNA el cual se encuentra precipitado como un botón blanco en el fondo del microtubo, se dejó secar por 45 minutos aproximadamente.

Se llevó a cabo la hidratación del DNA a cada muestra se le agregaron de 200 a 300 µL de buffer TE, se incubó en baño maría para hidratar la muestra de DNA en el buffer TE a 65°C durante una hora.

Se almacenaron las muestras a 4°C, transferidas en un criotubo, el plasma y suero se almacenaron en ultracongelador a -80°C. La cantidad de DNA extraída se cuantificó utilizando el equipo Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific, MA, USA*), a partir del cual fue determinada la contaminación con compuestos orgánicos y proteínas al establecer la relación de las lecturas 260/230 y 260/280 respectivamente.

### **Obtención de LBA**

Se llevó a cabo la recolección de 10mL de lavado bronquioalveolar de 22 pacientes con AR-NID, el cual fue obtenido por médicos especialistas en el área de broncoscopia, esto solo en los pacientes que lo requerían como prueba de

diagnóstico y para descartar otras patologías pulmonares, se congelaron a -80°C hasta su análisis.

### Genotipificación

Se llevó a cabo la discriminación alélica de 8 SNP en *PADI2* y *PADI4* a todos los individuos mediante PCR en tiempo real (qPCR), con ensayos de sondas TaqMan (*Applied Biosystems, CA, USA*), *PADI2* (rs2235926, rs2057094, rs2076615 y rs1005753) y *PADI4* (rs11203366, rs11203367, rs874881 y rs1748033). Los SNP se seleccionaron con base en las asociaciones previas con AR y/o AR-NID.

El DNA fue ajustado a 15 ng/μL, se agregaron 3 μL de DNA ajustado de cada individuo en un pozo de reacción de la placa óptica, se preparó una mezcla de reacción con 6.5 μL de sonda TaqMan, 200 μL de *Master Mix TaqMan™* (*Applied Biosystems, CA, USA*), 300 μL de agua libre de nucleasas. Se agregaron 5 μL de la mezcla de reacción a cada pozo, posteriormente se agitó y centrifugó a 1500 rpm para introducir en el termociclador *7300 Real Time PCR system* (*Applied Biosystems, CA, USA*) en las siguientes condiciones:

**Tabla 2: Condiciones para llevar a cabo la discriminación alélica mediante qPCR**

Paso	Temperatura	Tiempo
1	60° C	30 s
2	95° C	10 min
3 (40 ciclos)	95° C	15 s
	60° C	1 min
4	4° C	∞

Condiciones en las que se lleva a cabo la discriminación alélica en el termociclador.

---

---

## **Cuantificación de PAD2 y PAD4**

Se realizó la determinación de PAD2 y PAD4 mediante la técnica de inmunoensayos (ELISA) mediante PAD2 (*human*) ELISA Kit y PAD4 (*human*) ELISA Kit (ítem: 501450 y 501460 de *Cayman Chemical, MI, USA*), siguiendo las instrucciones del fabricante, con un rango de detección de 0.156-10 ng/mL.

Se tomó una muestra de sangre en un tubo con gel activador del coágulo, el cual se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos, las muestras de suero fueron utilizadas a una dilución 1:4 con buffer de ensayo incluido en el kit para la determinación de proteínas PAD2 y PAD4 respectivamente.

Se tomaron 4 mL de sobrenadante de lavado bronquioalveolar de pacientes con AR-NID y se concentraron mediante el *Vacufuge Concentrator (Eppendorf, MA, USA)* a 14 000 rpm durante 12 horas, posteriormente se resuspendieron en 200  $\mu$ L de buffer del inmunoensayo y se llevó a cabo el ensayo de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Se llevó a cabo la determinación de proteínas PAD2 y PAD4 en cada paciente por triplicado, la lectura se realizó en el lector fotométrico *iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad, CA, USA)* a una longitud de onda de 450nm.

## **Análisis de resultados**

Se realizó la prueba de normalidad de datos mediante Kolmogorov-Smirnov.

Se realizaron los cálculos de la determinación de proteínas a partir de la lectura de absorbancias obtenidas de las curvas con concentraciones de proteínas PAD2 y PAD4 entre 0-10 ng/ $\mu$ L tomando 8 puntos, donde se obtuvo la ecuación de la recta.

---

---

A partir de cada curva se interpolaron las concentraciones de proteína de la absorbancia determinada.

Se llevó a cabo la comparación de los niveles de PAD2 y PAD4 entre grupos de pacientes con AR y AR-NID mediante la prueba U de Mann Whitney.

El análisis de frecuencias alélicas y genotípicas se realizó con el programa Epidat versión 3.1, empleando la prueba exacta de Fisher, tomando un valor de  $p < 0.05$  como significativo, OR e IC 95%, el análisis de haplotipos se llevó a cabo con el programa Haploview v4.2.

El análisis de variables demográficas y clínicas de pacientes con AR y AR-NID: en variables categóricas se realizó la prueba exacta de Fisher, y U de Mann-Whitney en variables cuantitativas continuas, así como un análisis de correlación mediante  $r^2$  de Pearson.

Las comparaciones de las concentraciones de proteína de acuerdo con los genotipos de los SNP se utilizó la prueba Kruskal-Wallis, con posterior corrección con la prueba de Bonferroni, en el software R versión 3.5.1.

## 8) Resultados

### **Demográficos y clínicos**

En la tabla 3 se muestran las características clínicas y demográficas de los pacientes y el grupo de individuos clínicamente sanos, los cuales fueron seleccionados de acuerdo con factores de riesgo previamente reportados, como lo son el sexo, edad y tabaquismo, en donde se tienen 3 individuos por cada paciente.

Se incluyeron 127 pacientes con artritis reumatoide y neumopatía intersticial difusa y 160 pacientes con artritis reumatoide, de los cuales >44% tenían anti-CCP positivos y factores de riesgo como tabaquismo, exposición a aves o a humo de leña variables, y a otros factores entre estos se encuentran el petróleo, carbón y exposiciones a factores ocupacionales. Así como un grupo de 620 individuos clínicamente sanos, de los cuales el 24.19% son fumadores.

### **Genotipificación**

Se obtuvo la genotipificación de los polimorfismos en *PADI2* y *PADI4* a los cuales se les realizó la prueba de  $X^2$  para observar si cumplía con el equilibrio de Hardy-Weinberg, el rs2235926 no cumple con equilibrio, se obtuvo un valor de  $p=8.9 \times 10^{-24}$  (Tabla 4), este SNP no se tomó en cuenta para los análisis posteriores con los niveles de proteínas. Se continuaron los análisis con el resto de SNP.

Las frecuencias genotípicas y alélicas obtenidas de la genotipificación de SNP en *PADI2* y *PADI4* se muestran en las tablas (tabla5 y 6) en donde se describen las frecuencias obtenidas entre los grupos de pacientes con AR-NID y AR, así como el análisis con la prueba exacta de Fisher, en donde se muestra el OR y su IC95%

---

---

Las frecuencias del alelo menor (T) en el rs2235926 en el grupo AR-NID es de 62.05%, en el grupo AR es de 51.09%, mientras que en el grupo CS es de 47.33%.

Las frecuencias del alelo menor del rs2057094-T en AR-NID=52.54%, en AR=48.20 y en CS=41.23%, en la comparación del grupo de artritis vs. CS se obtiene un OR=1.45 ( $p=0.001$ ).

En el rs2076615-C son de 28.70% en AR-NID, 30.45% en AR y 37.21% en CS, no hay diferencia en la comparación de AR-NID, sin embargo, al realizar la comparación de todos los individuos con Artritis con los CS se obtiene un OR=0.71.

El rs1005753-G las frecuencias en AR-NID=29%, AR=19.4% y CS=31.23%, al comparar AR-NID vs. AR se obtiene un OR=1.71 ( $p=0.017$ ), al comparar el grupo de artritis vs. CS se obtiene un OR=0.71( $p=0.006$ ).

En la Tabla 6 se muestran las comparaciones realizadas de las frecuencias alélicas y genotípicas de los SNP en *PADI4* entre los 3 grupos de estudio, en el rs11203366 se obtiene un OR=3.08 ( $p=0.004$ ) en el genotipo AA, y un OR=1.7 en el alelo A. El rs11203367-G OR=1.5 ( $p=0.37$ ), el genotipo GG con OR=2.4, en la comparación de AR-NID vs. AR, de estos 2 SNP no hay diferencia en la comparación de Artritis vs. CS.

El rs1748033-A en la comparación de Artritis vs. CS se obtuvo un OR=1.47( $p<0.01$ ). y en el rs874881-G se obtuvo un OR=1.7, en el genotipo CG un OR=2.69 y GG OR=2.53, así como en la comparación de Artritis vs. CS el alelo G tiene un OR=1.43.

**Tabla 3: Características demográficas y clínicas de los grupos de estudio**

	<b>AR-NID</b>	<b>AR</b>	<b>CS</b>	<b>p<sup>§</sup></b>
<b>n</b>	127	160	620	
<b>Hombres, n (%)</b>	38 (29.92)	10 (6.25)	359(57.90)	<0.01
<b>Edad</b>	52 (14)	54 (18)	49 (17)	<0.01
<b>Anti-CCP positivos, n (%)</b>	57(44.88)	84(52.50)	-	0.24
<b>Exposición, n (%)</b>				
<b>Tabaquismo</b>	30 (24.60)	20 (12.50)	150 (24.19)	0.04
<b>Humo de leña</b>	31 (24.41)	20 (12.50)	-	0.01
<b>Aves</b>	21 (16.54)	7 (4.38)	-	<0.01
<b>Otros</b>	16 (12.60)	14 (8.75)	-	0.33
<b>Sin exposiciones</b>	29 (21.85)	99 (61.88)	-	<0.01
<b>Espirometría</b>				
<b>FEV<sub>1</sub></b>	55.5(26-89)	75.5(64-99)	-	<0.01
<b>FVC</b>	66(27-98)	94.5(75.5-113)	-	<0.01
<b>FEV<sub>1</sub>/FVC</b>	81.5(30-103)	83(58-110)	-	0.04

Las variables cuantitativas se expresan en mediana (rango intercuartílico) y las categóricas en número (porcentaje), AR-NID= artritis reumatoide y neumopatía intersticial difusa, AR= artritis reumatoide, CS= individuos clínicamente sanos, Anti-CCP= anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados, FEV<sub>1</sub>= volumen espiratorio forzado en 1 segundo, FVC= capacidad vital forzada, §: comparación AR-NID vs. AR, prueba exacta de Fisher, Kruskal Wallis y U-Mann-Whitney.

**Tabla 4: Polimorfismos estudiados en PADI2 y PADI4 y equilibrio de Hardy-Weinberg.**

<b>Gen</b>	<b>SNP</b>	<b>Alelos</b>	<b>Localización</b>	<b>Cambio de aminoácido</b>	<b>Observado</b>	<b>Predicho</b>	<b>p</b>	<b>MAF</b>
PADI2	rs2235926	C>T	3'UTR	NA	0.118	0.5	<b>8.9799E-24</b>	0.491
	rs2057094	C>T	Intrón	NA	0.516	0.487	0.301	0.418
	rs2076615	A>C	Exón	Gly/Gly	0.421	0.395	0.260	0.271
	rs1005753	T>G	Intrón	NA	0.445	0.415	0.204	0.293
PADI4	rs11203366	G>A	Exón	Gly/Ser	0.471	0.497	0.353	0.459
	rs11203367	A>G	Exón	Val/Ala	0.5	0.497	1.000	0.461
	rs874881	C>G	Exón	Gly/Ala	0.503	0.498	0.972	0.472
	rs1748033	G>A	Exón	Leu/Leu	0.516	0.498	0.561	0.466

Valores de p obtenido mediante la prueba  $X^2$ , MAF: frecuencia del alelo menor en mexicanos de los ángeles (HapMap, 2017).



**Tabla 5: Análisis de genotipos y alelos de SNP en PADI2**

PADI2	AR-NID		AR		CS		AR-NID vs. AR			Artritis* vs. CS		
	n	F%	n	F%	n	F%	p	OR	IC	p	OR	IC
rs2235926	83		92		356							
CC	26	31.33	39	42.39	169	47.47	0.118			0.04	1	0.89-2.93
CT	11	13.25	12	13.04	37	10.39					1.62	
TT	46	55.42	41	44.57	150	42.13					1.51	
C	63	37.95	90	48.91	375	52.67	0.041	1.57	1.02-2.4	0.006	0.7	0.54-0.90
T	103	62.05	94	51.09	337	47.33					0.639	
rs2057094	118		111		616							
CC	42	35.59	45	40.54	269	43.67	0.455			<b>0.005</b>	1	0.60-1.30
CT	28	23.73	25	22.52	186	30.19					0.88	
TT	48	40.68	41	36.94	161	26.14					1.71	
C	112	47.46	115	51.80	724	58.77	0.4			<b>0.001</b>	0.69	0.56-0.86
T	124	52.54	107	48.20	508	41.23					1.45	
rs2076615	115		110		606							
AA	53	46.09	47	42.73	187	30.86	0.638			<b>0.0004</b>	1	0.41-0.78
AC	58	50.43	59	53.64	387	63.86					0.57	
CC	4	3.48	4	3.64	32	5.28					0.47	
A	164	71.30	153	69.55	761	62.79	0.757			<b>0.004</b>	1.41	1.11-1.78
C	66	28.70	67	30.45	451	37.21					0.71	
rs1005753	117		111		610							
TT	57	48.72	70	63.06	285	46.72	<b>0.012</b>	1.00	0.95-2.82	<b>0.005</b>	1	0.55-1.04
TG	52	44.44	39	35.14	269	44.10					0.76	
GG	8	6.84	2	1.80	56	9.18					0.4	
T	166	70.94	179	80.63	839	68.77	<b>0.017</b>	0.59	0.38-0.90	<b>0.006</b>	1.41	1.10-1.80
G	68	29.06	43	19.37	381	31.23					1.71	

F%=Frecuencia en porcentaje, Prueba exacta de Fisher, p <0.05 se toma como significativo, OR: *Odds ratio*, IC95%: intervalo de confianza al 95%. \* se incluyeron todos los individuos con AR y AR-NID en comparación con individuos clínicamente sanos.

**Tabla 6: Análisis de genotipos y alelos de SNP en PADI4**

<i>PADI4</i>	AR-NID		AR		CS		AR-NID vs. AR			Artritis* vs. CS		
	n	F%	n	F%	n	F%	p	OR	IC	p	OR	IC
rs11203366	116		114		607							
GG	25	21.55	41	35.96	188	30.5		1				
GA	61	52.59	57	50	290	47	<b>0.004</b>	1.76	0.95-3.25	0.8522		
AA	30	25.86	16	14.04	129	20.9		3.08	1.40-6.74			
G	111	47.84	139	60.96	666	54.85	<b>0.005</b>	0.59	0.41-0.85	0.869		
A	121	52.16	89	39.04	548	45.14		1.7	1.18-2.47			
rs11203367	111		115		608							
AA	25	22.52	42	36.52	183	29.7		1				
AG	66	59.46	59	51.3	298	48.3	<b>0.023</b>	1.88	1.02-3.45	0.3189		
GG	20	18.02	14	12.17	127	20.6		2.4	1.03-5.58			
A	116	52.25	143	62.17	664	54.6	<b>0.037</b>	0.666	0.46-0.97	0.3463		
G	106	47.75	87	37.83	552	45.4		1.5	1.03-2.18			
rs1748033	116		114		609							
GG	19	16.38	17	14.91	155	25.1					1	
GA	58	50	59	51.57	307	49.8	0.895			<b>0.0004</b>	1.64	1.08-2.5
AA	39	33.62	38	33.33	147	23.8					2.26	1.43-3.56
A	136	58.62	135	59.21	601	49.34	0.925			<b>0.0006</b>	1.47	1.18-1.83
G	96	41.38	93	40.79	617	50.66					0.68	0.55-0.84
rs874881	116		117		611							
CC	27	23.28	58	44.62	152	24.7		1			1	
CG	69	59.48	45	42.31	318	51.5	<b>0.003</b>	2.69	1.51-4.80	<b>0.0002</b>	0.64	0.46-0.90
GG	20	17.24	14	13.08	141	22.9		2.53	1.15-5.58		0.43	0.27-0.68
C	123	53.03	171	65.77	622	50.9	<b>0.004</b>	0.59	0.41-0.84	<b>0.0009</b>	1.43	1.16-1.77
G	109	46.95	89	34.23	600	49.1		1.7	1.18-2.45		0.69	0.56-0.86

F%=frecuencia en porcentaje, Prueba exacta de Fisher, p <0.05 se toma como significativo, OR: *Odds ratio*, IC95%: intervalo de confianza al 95%. \* se incluyeron todos los individuos con AR y AR-NID en comparación con individuos clínicamente sanos.

## Haplotipos

Se realizó un análisis de haplotipos, en donde se excluyó el polimorfismo rs2057094 en *PADI2* el cual no cumple con equilibrio de Hardy-Weinberg, se obtuvieron 2 bloques en los cuales se encuentran 2 SNP en *PADI2*: rs2057094-rs2076615, en *PADI4*: rs11203366- rs11203367-rs874881-rs1748033.

Se muestran en la figura 3 el gráfico de desequilibrio de ligamiento de los 7 polimorfismos analizados.

Se obtuvieron 8 haplotipos, de los cuales 4 son significativos en la comparación de las frecuencias entre los individuos con AR-NID vs. AR. El haplotipo GACA con un OR= 1.395 (p=0.004), el AGGA con un OR=0.116 (p=0.009).

**Tabla 7: Análisis del bloque de haplotipo en PADI4**

Haplotipo	AR-NID (F%)	CS (F%)	p	OR (IC95%)
<b>GACA</b>	46.4	34.48	<b>0.004</b>	1.395 (1.12-1.74)
<b>AGGG</b>	29.38	31.39	NS	
<b>GAGG</b>	9.9	13.62	<b>0.013</b>	0.627 (0.44-0.90)
<b>AGCA</b>	7.27	10.37	<b>0.029</b>	0.625 (0.42-0.94)
<b>GACG</b>	3.5	4.1	NS	
<b>AACA</b>	1.6	2.1	NS	
<b>GGGG</b>	1.5	2.1	NS	
<b>AGGA</b>	0.45	1.29	<b>0.009</b>	0.116 (0.02-0.86)

F%= frecuencias en porcentaje, comparación de haplotipos mediante la prueba exacta de Fisher, p <0.05 se toma como significativo, OR: *Odds ratio*, IC95%: intervalo de confianza al 95%.

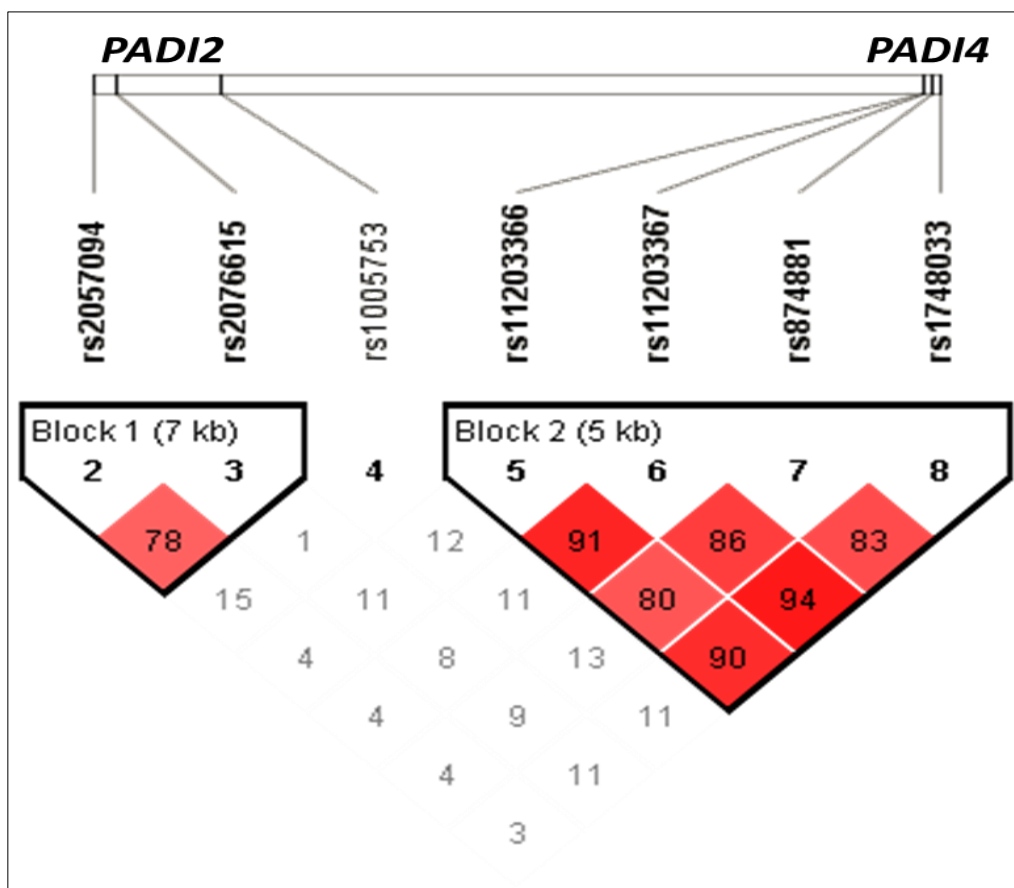


Figura 3: Análisis de haplotipos en PADI2 y PADI4

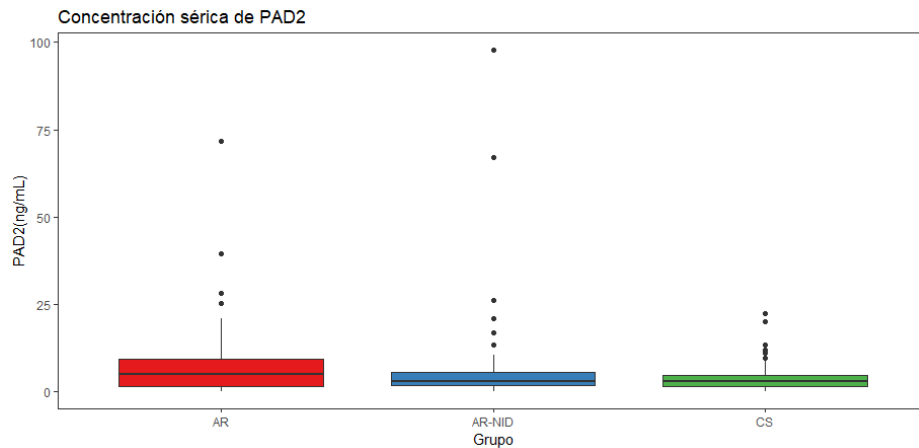
### Proteínas PAD2 y PAD4

Se realizó la cuantificación de proteínas PAD2 y PAD4 en suero de pacientes con AR y AR-NID, así como en individuos clínicamente sanos, en la tabla 8 se muestran las variables demográficas y clínicas.

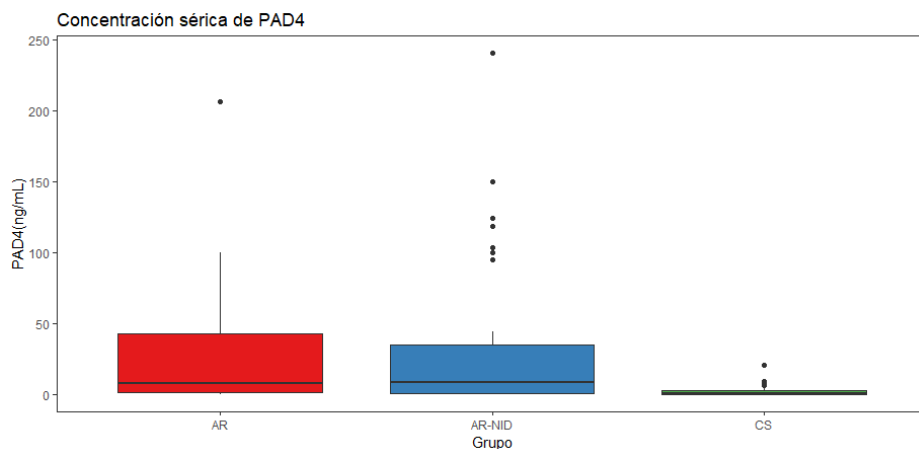
Los individuos seleccionados para la determinación de proteínas fueron en aquellos de los que se tiene muestra de sangre y LBA, así como un grupo de individuos fumadores, en donde se han descrito un incremento en los niveles de proteínas PAD.

PAD2 en suero en individuos con AR-NID se encuentran ~3 ng/mL en el grupo de AR=4.87 ng/mL, cercano al valor que tienen los individuos clínicamente sanos 2.85 ng/mL. En LBA los niveles de PAD2 detectados fueron de 0.3-15.6 ng/mL.

PAD4 en suero de AR-NID=8.65 ng/mL, en el grupo de AR= 7.91 y en CS=1.05 (p>0.01) en donde hay una diferencia estadísticamente significativa, en LBA, los niveles se encuentran en ~10 ng/mL.



**Figura 4** Concentración de PAD2 en suero en los grupos de AR-NID, AR y CS



**Figura 5:** Concentración de PAD4 en suero en los grupos de AR-NID, AR y CS

---

---

Se realizó la prueba de Kruskal Wallis en las comparaciones de los grupos, no se obtuvo una diferencia significativa en la determinación de PAD2.

Los niveles de PAD4 en la comparación de los grupos AR y AR-NID, no hay diferencia, sin embargo, en las comparaciones de los grupos AR vs. CS ( $p < 0.001$ ), y en el grupo de AR-NID vs. CS ( $p = 0.001$ ) se observan diferencias (Figura 4 y 5).

### **Evaluación de autoanticuerpos**

Una de las variables de interés son los niveles de anti-CCP, cerca del 50% de individuos con AR tienen autoanticuerpos anti-CCP positivos, en individuos con AR-NID se presentan en 44%, al comparar los niveles de autoanticuerpos, en la tabla 8 se observa que los individuos con AR-NID presentan menores niveles de anti-CCP (76.96 U/mL) en comparación con el grupo de AR (259 U/mL).

**Tabla 8: Subgrupo de pacientes e individuos a los que se les realizó la determinación de PAD.**

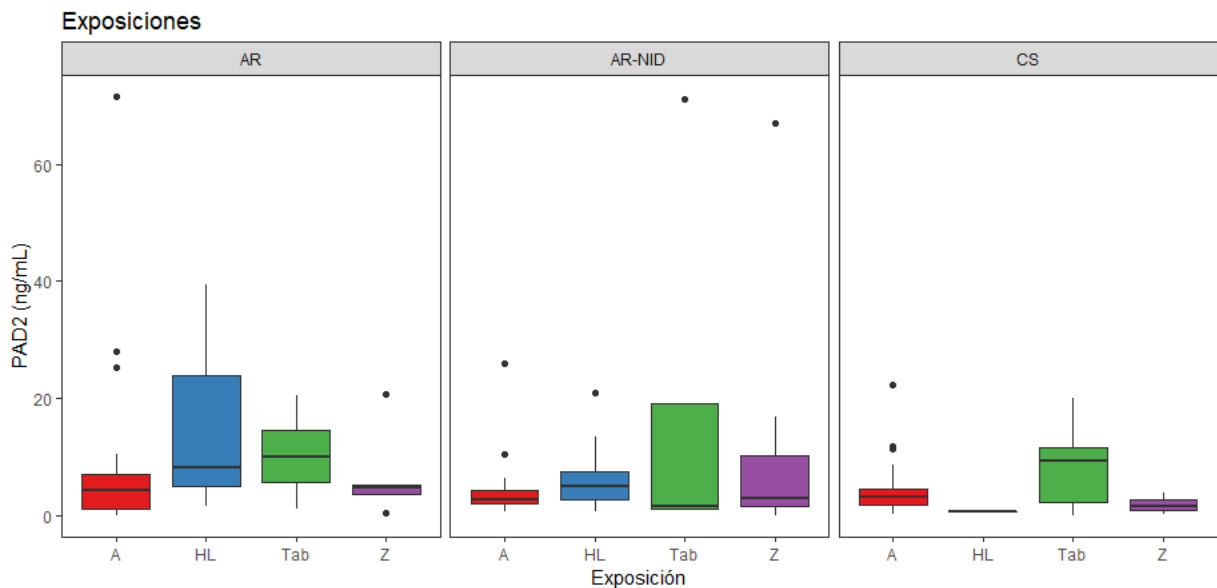
	<b>AR-NID</b>	<b>AR</b>	<b>CS</b>	<b>p</b>
<b>n</b>	34	31	46	
<b>Edad (años)</b>	59 (50-65)	55 (48.5-63)	53 (47-68)	0.01 <sup>*</sup>
<b>Sexo femenino, n (%)</b>	29 (85.29)	29 (93.55)	22 (47.83)	NS
<b>Tabaquismo, n (%)</b>	6 (17.65)	7 (22.58)	17(36.96)	-
<b>IT</b>	4.83 (2.9-6.9)	2.4 (1.7-5.8)	5 (3.3-7)	NS
<b>EHL, n (%)</b>	10 (29.41)	6 (19.35)	7 (15.22)	-
<b>IEHL</b>	64 (53-96.5)	102 (91.5-124.5)	70 (37-130)	NS
<b>anti-CCP (U/mL)</b>	76.96 (9.7-239)	259 (141.98-265.38)	NA	0.002 <sup>§</sup>
<b>PAD2 (ng/mL)</b>	2.97 (1.85-5.52)	4.87 (1.5-9.39)	2.85 (1.51-4.66)	0.298
<b>PAD4 (ng/mL)</b>	8.65 (0.88-35.34)	7.91 (1.29-43.2)	1.05 (0.27-2.67)	<0.001 <sup>*</sup>
<b>PAD2_LBA (ng/mL)</b>	0.3 (0-15.57)	NA	NA	-
<b>PAD4_LBA (ng/mL)</b>	10 (5.76-35.28)	NA	NA	-
<b>FVC (%)</b>	61 (42.5-74)	91 (80.5-100)	100 (90.5-116.2)	<0.001 <sup>§*</sup>
<b>FEV<sub>1</sub> (%)</b>	60 (42.5-74)	94 (83-102)	103 (94.5-121.2)	<0.001 <sup>§*</sup>
<b>FEV<sub>1</sub>/FVC (%)</b>	82.5 (40.6- 93.1)	83 (80-89)	82.1 (78-84.58)	0.167

Variables cuantitativas expresadas en mediana (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>); AR-NID: pacientes con artritis reumatoide y neumopatía intersticial difusa, AR: pacientes con artritis reumatoide, Anti-CCP: anticuerpos antipeptídicos cíclicos citrulinados, IT: índice tabáquico, EHL: exposición a humo de leña, IEHL: índice de exposición a humo de leña (h/año), FEV<sub>1</sub>: volumen espiratorio forzado en 1 segundo, FVC: capacidad vital forzada, PAD: peptidil arginina deiminasa, LBA: Lavado bronquioalveolar. Compara ración de grupos: <sup>§</sup> AR-NID vs. AR, <sup>\*</sup> AR-NID vs. CS, <sup>¶</sup> AR vs. CS.

## Exposiciones

Se realizó la comparación de niveles de PAD2 y PAD4 de acuerdo con las principales exposiciones ambientales y la presencia de artritis y neumopatía, así como en individuos clínicamente sanos, en donde se obtuvieron diferencias en las frecuencias de las exposiciones y los niveles de proteínas PAD2 y PAD4.

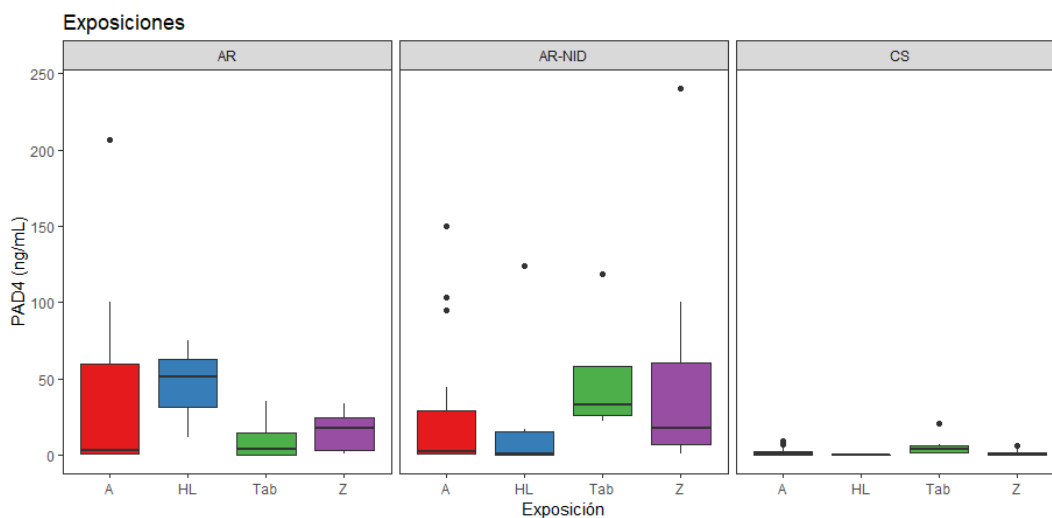
PAD2, en individuos con AR tienen mayores niveles de proteína en suero, similares a los que se presentan en los individuos fumadores ( $p=0.043$ ), se muestran en la figura 6.



**Figura 6: Niveles de PAD2 en diferentes exposiciones:** A-sin exposiciones, HL-humo de leña, Tab-tabaquismo, Z- con más de 2 exposiciones.



Por otro lado, PAD4 se encuentra incrementada en individuos con AR que se exponen a humo de leña, comparados con los que tienen AR-NID, y se encuentra incrementada en individuos con AR-NID que se exponen a tabaquismo, en este caso, los niveles de PAD4 se ven incrementados en comparación con los individuos CS, los cuales presentan niveles menores a 5ng/mL de PAD4 en las diferentes exposiciones a factores ambientales ( $p < 0.01$ ), como se observa en la figura 7.



**Figura 7: Niveles de PAD4 en diferentes exposiciones:** A-sin exposiciones, HL-humo de leña, Tab-tabaquismo, Z- con más de 2 exposiciones.

## **Análisis de niveles de PAD2 y PAD4 respecto al modelo genético codominante en los grupos AR-NID y AR**

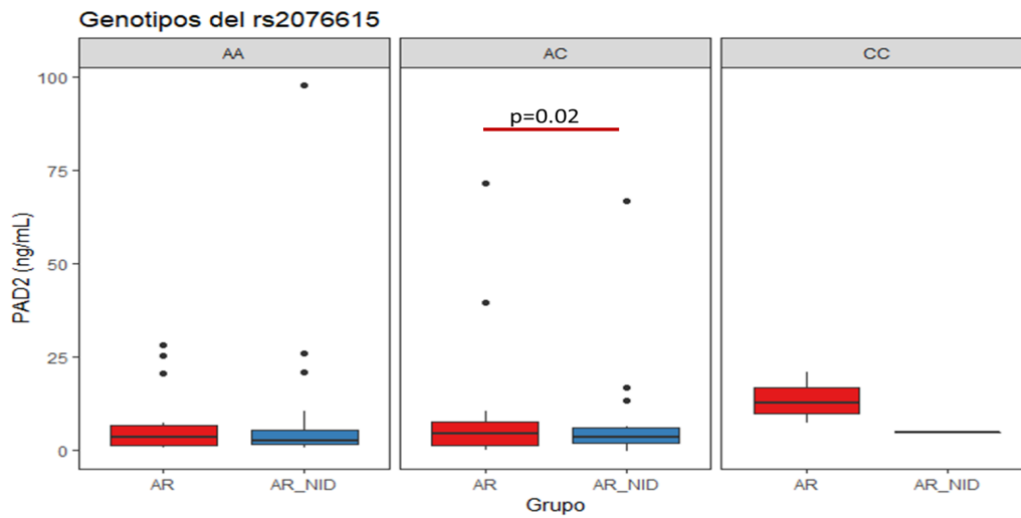
Se llevó a cabo el análisis de la comparación de los niveles de proteínas PAD2 y PAD4 y los genotipos en modelo genético codominante, se realizó en los pacientes con AR-NID y AR el análisis de los niveles de PAD mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Se muestran las figuras en donde se presentan las diferencias marcadas en el genotipo con una  $p < 0.05$  (figura 9 a 14). Se resume en la siguiente tabla (tabla 9) los genotipos estadísticamente significativos, así como los niveles de PAD2 y PAD4 respectivos a cada SNP.

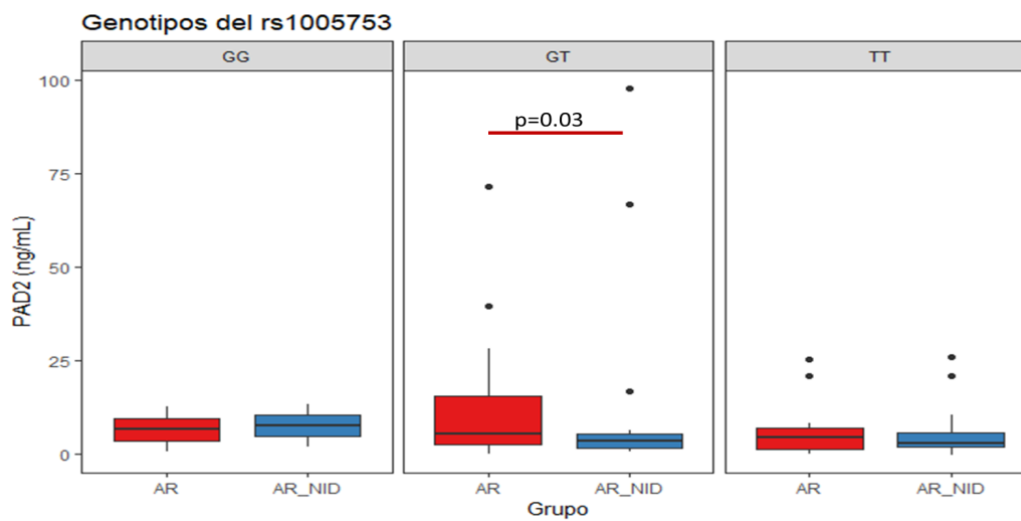
**Tabla 10: Niveles de PAD con diferencia significativa dependiente del genotipo**

<b>Proteína</b>	<b>SNP-genotipo asociado</b>	<b>AR-NID</b>	<b>AR</b>	<b>p</b>
<b>PAD2</b>	rs2076615-AC	2.9(1.8-5.6)	5.6(2.1-9.9)	0.02
	rs1005753-GT	3.3(1.5-5.5)	5.5(2.9-14.9)	0.03
<b>PAD4</b>	rs11203366-GG	4.9(0.4-39)	3.3(1.4-24.4)	0.009
	rs11203367-AA	4.9(0.4-39.1)	3.3(1.4-29.4)	0.009
	rs11203367-GG	94.9(19.8-134.3)	5.6(2.4-22.4)	0.042
	rs1748033-TT	0.9(0.33-126.7)	2.9(0.3-15.1)	0.002
	rs874881-CC	6.8(0.6-82.9)	2.8(0.6-10.1)	<0.001

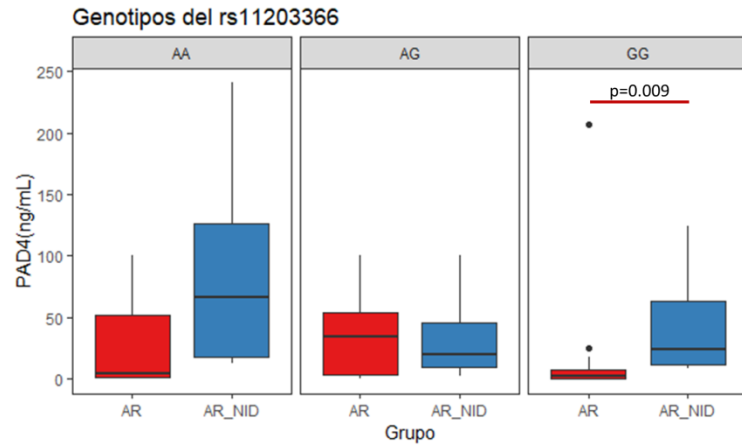
Mediana de los niveles de PAD2 y PAD4 (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>), valor de p en la comparación de AR-NID vs. AR.



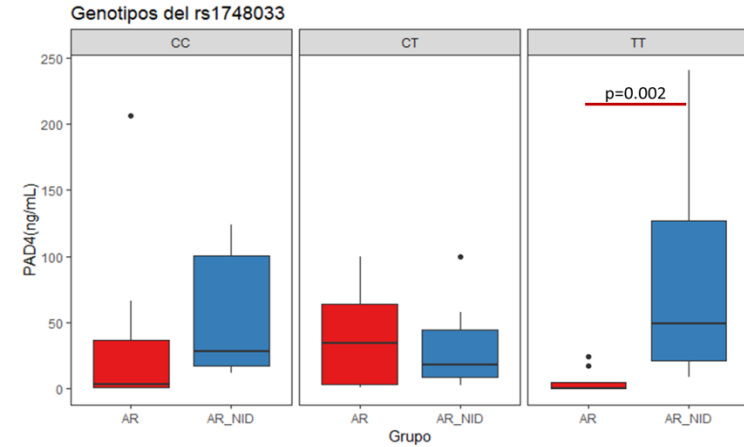
**Figura 8: PAD2 en genotipos del rs2076615 en los grupos AR-NID y AR**



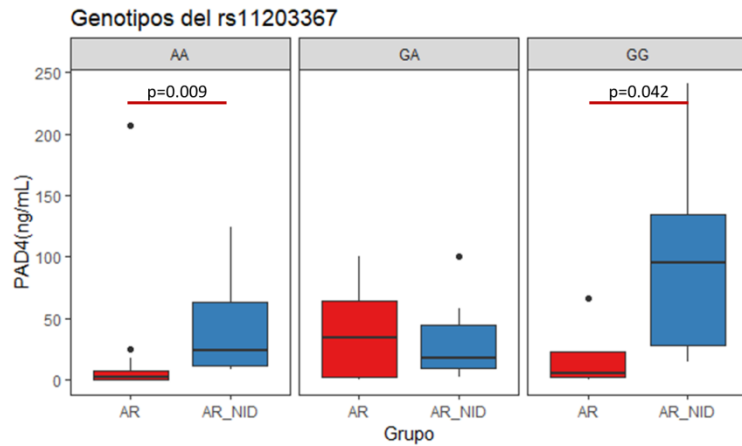
**Figura 9: PAD2 en genotipos del rs1005753 en los grupos AR-NID y AR**



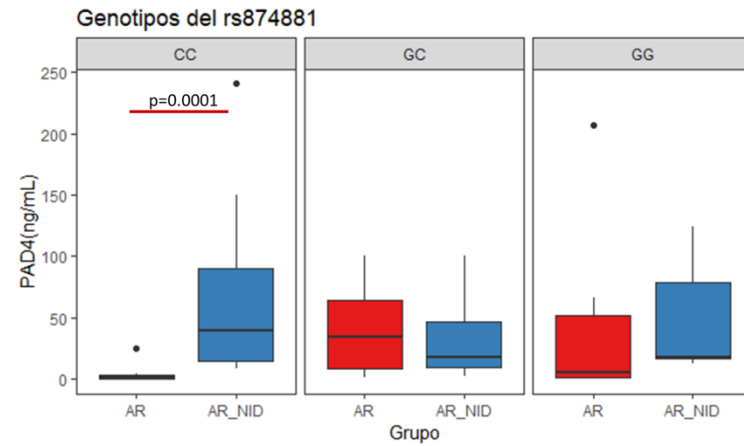
**Figura 10: PAD4 en genotipos del rs11203366 en los grupos AR-NID y AR**



**Figura 12: PAD4 en genotipos del rs1748033 en los grupos AR-NID y AR**



**Figura 11: PAD4 en genotipos del rs11203367 en los grupos AR-NID y AR**



**Figura 13: PAD4 en genotipos del rs874881 en los grupos AR-NID y AR**

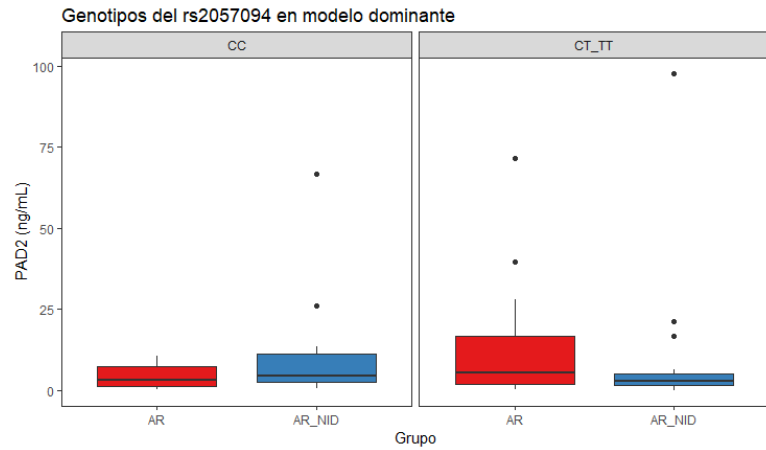
## Análisis de polimorfismos en modelo dominante

Tabla 10: Análisis de SNP en modelo dominante

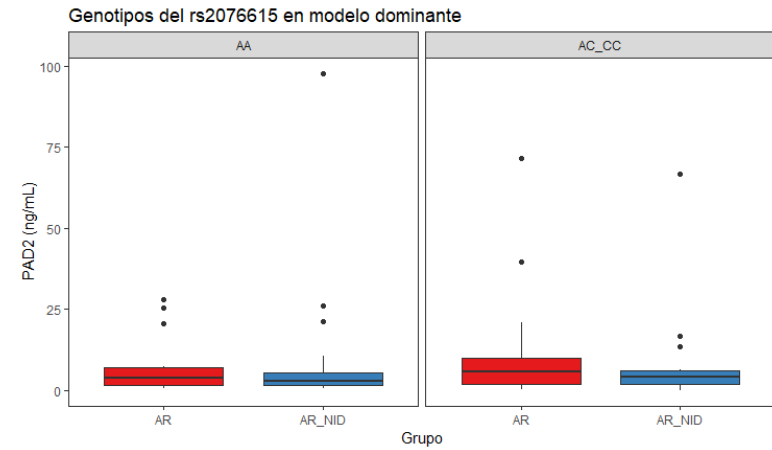
	AR-NID		AR		CS		p	AR-NID vs. AR		p	Artritis* vs. CS		
	n	F%	n	F%	n	F%		OR	IC		OR	IC	
PAD12	rs2235926	83		92		356							
	CC	26	31.33	39	42.39	169	47.47				<b>0.026</b>	0.65	0.45-0.95
	CT+TT	57	68.67	53	57.61	187	52.53	0.159				1.53	1.06-2.22
	rs2057094	118		111		616							
	CC	42	35.59	45	40.54	269	43.67	0.496			0.158		
	CT+TT	76	64.41	66	59.46	347	56.33						
	rs2076615	115		110		606							
	AA	53	46.09	47	42.73	187	30.86	0.6874			<b>0.0003</b>	1.79	1.31-2.46
	AC+CC	62	53.91	63	57.27	419	69.14					0.56	0.41-0.76
	rs1005753	117		111		610							
	TT	57	48.72	70	63.06	285	46.72	<b>0.033</b>	0.56	0.38-0.95	<b>0.024</b>	1.43	1.06-1.95
	TG+GG	60	51.28	41	36.94	325	53.28		1.8	1.06-3.05		0.7	0.51-0.95
PAD14	rs11203366	116		114		607							
	GG	25	21.55	41	35.96	188	30.97	<b>0.019</b>	0.49	0.27-0.88	0.556		
	AG+AA	91	78.45	73	64.04	419	69.03		2.04	1.24-3.67			
	rs11203367	111		115		608							
	AA	25	22.52	42	36.52	183	30.09	<b>0.029</b>	0.51	0.28-0.91	0.932		
	GA+GG	86	77.48	73	63.48	425	69.9		1.98	1.10-3.55			
	rs1748033	116		114		609							
	GG	19	16.38	17	14.91	155	25.45	0.856			<b>0.0023</b>	0.54	0.36-0.81
	AG+AA	97	83.62	97	85.09	454	74.55					1.84	1.23-2.74
	rs874881	116		117		611							
	CC	27	23.28	58	49.57	152	24.88	<b>0.00004</b>	0.31	0.18-0.54	<b>0.0011</b>	1.73	1.25-2.4
	CG+GG	89	76.72	59	50.43	459	75.12		3.24	1.85-5.69		0.58	0.42-0.80

F%= frecuencia en porcentaje, se realizó la prueba exacta de Fisher para las comparaciones de los genotipos en modelo genético dominante. \* se incluyeron todos los individuos con AR y AR-NID.

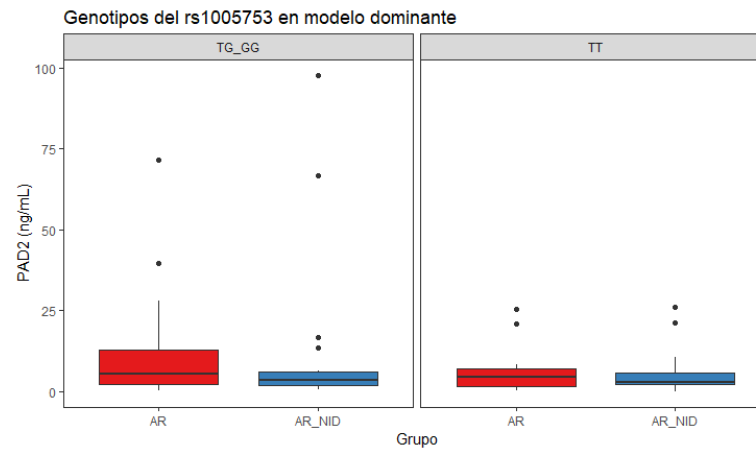
**Análisis de niveles de PAD2 y PAD4 respecto al modelo genético dominante en los grupos AR-NID y AR.**



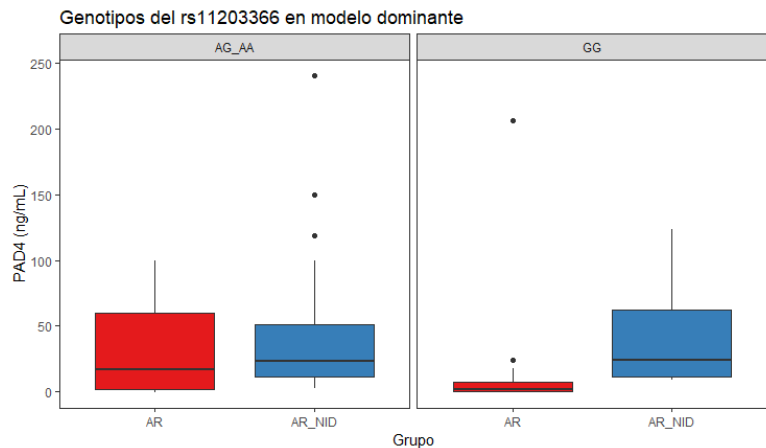
**Figura 14: Análisis de PAD2 en el modelo genético dominante del rs2057094.**



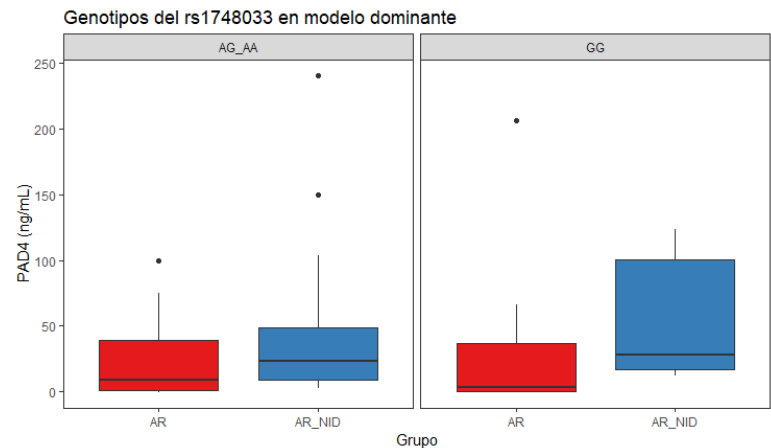
**Figura 15: Análisis de PAD2 en el modelo genético dominante del rs2076615**



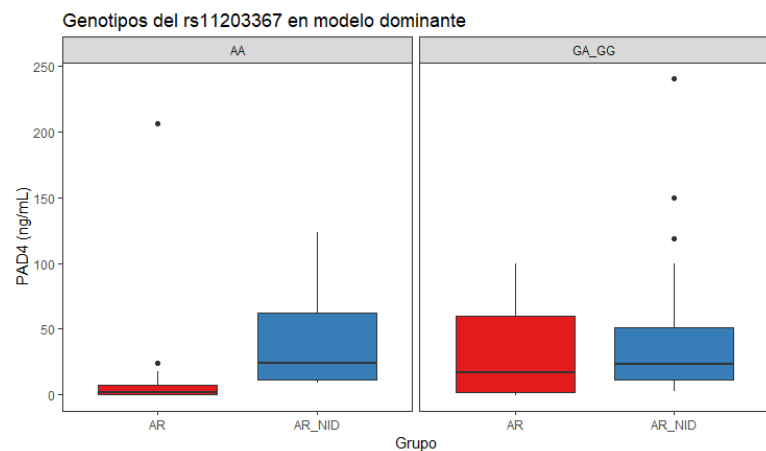
**Figura 16: Análisis de PAD2 en el modelo genético dominante del rs1005753**



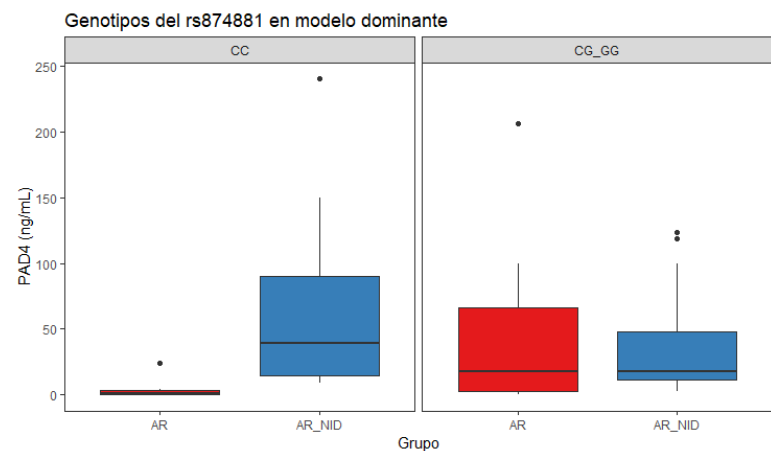
**Figura 17: Análisis de PAD4 en el modelo genético dominante del rs11203366**



**Figura 19: Análisis de PAD4 en el modelo genético dominante del rs1748033**



**Figura 18: Análisis de PAD4 en el modelo genético dominante del rs11203367**



**Figura 20: Análisis de PAD4 en el modelo genético dominante del rs874881**

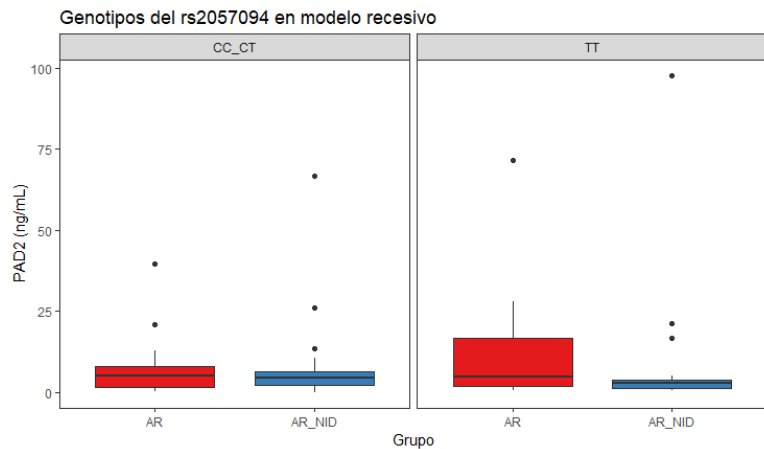
## Análisis de polimorfismos en modelo recesivo

**Tabla11: Análisis de SNP en modelo recesivo**

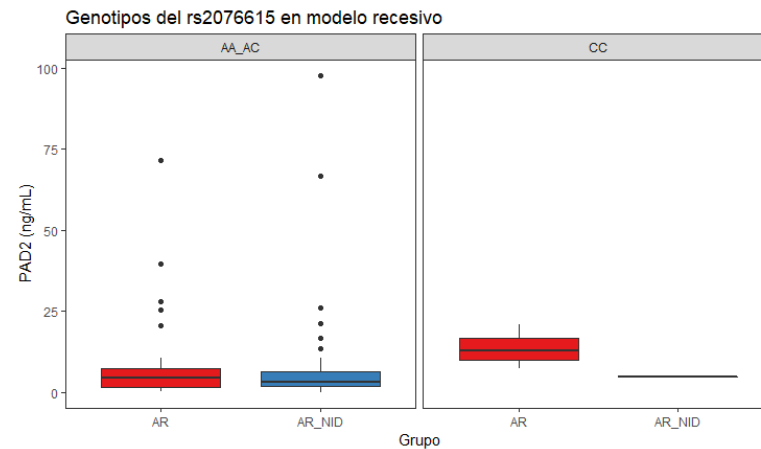
	AR-NID		AR		CS		p	AR-NID vs. AR		p	Artritis* vs. CS	
	N	F%	N	F%	N	F%		OR	IC		OR	IC
PAD12	rs2235926	83		92		356						
	CC+CT	37	45.57	51	55.43	206	57.87	0.174			0.114	
	TT	46	55.42	41	44.57	150	42.13					
	rs2057094	118		111		616						
	CC+TC	70	59.32	70	63.06	455	73.86	0.589				
	TT	48	40.68	41	36.94	161	26.14					
	rs2076615	115		110		606						
	AA+AC	111	96.52	106	96.36	574	94.71	1			0.364	
	CC	4	3.48	4	3.64	32	5.28					
rs1005753	117		111		610							
TT+TG	109	93.16	109	98.19	554	90.82	0.103			<b>0.021</b>	2.2	1.10-4.40
GG	8	6.84	2	1.80	56	9.18						
rs11203366	116		114		607							
GG+AG	86	74.14	98	85.96	478	78.75	<b>0.032</b>	0.47	0.23-0.92	0.775		
AA	30	25.86	16	14.04	129	21.25						
rs11203367	111		115		608							
AA+GA	91	81.98	101	87.82	481	79.11	0.265			0.061		
GG	20	18.02	14	12.17	127	20.89						
rs1748033	116		114		609							
GG+AG	77	66.38	76	66.66	462	75.86	1			<b>0.009</b>	0.63	0.45-0.88
AA	39	33.62	38	33.33	147	23.8						
rs874881	116		117		611							
CC+CG	96	82.76	103	88.03	470	76.92	0.271			<b>0.006</b>	1.76	1.17-2.64
GG	20	17.24	14	13.08	141	22.9						

F%= frecuencia en porcentaje, se realizó la prueba exacta de Fisher para las comparaciones de los genotipos en modelo genético dominante. \* se incluyeron todos los individuos con AR y AR-NID.

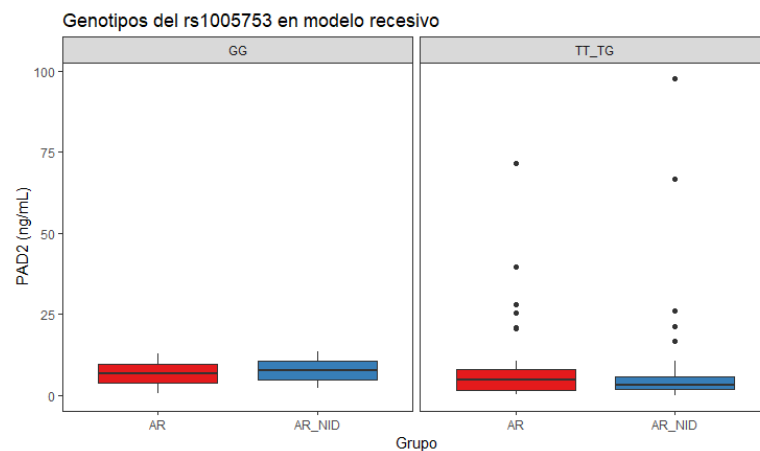




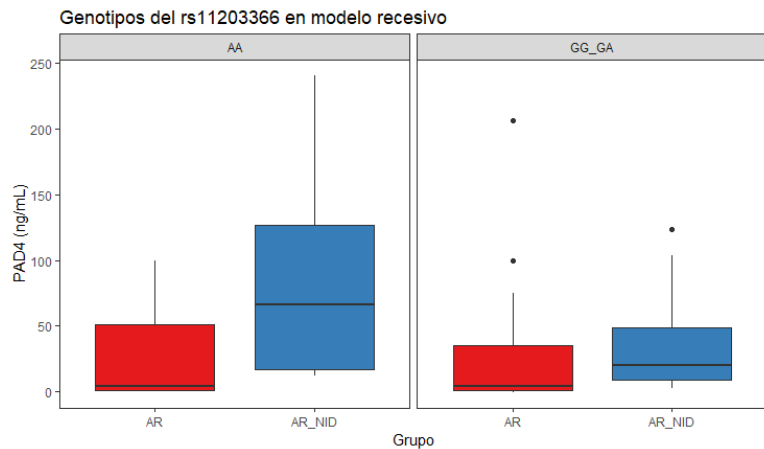
**Figura 21: Análisis de PAD2 en el modelo genético recesivo del rs2057094**



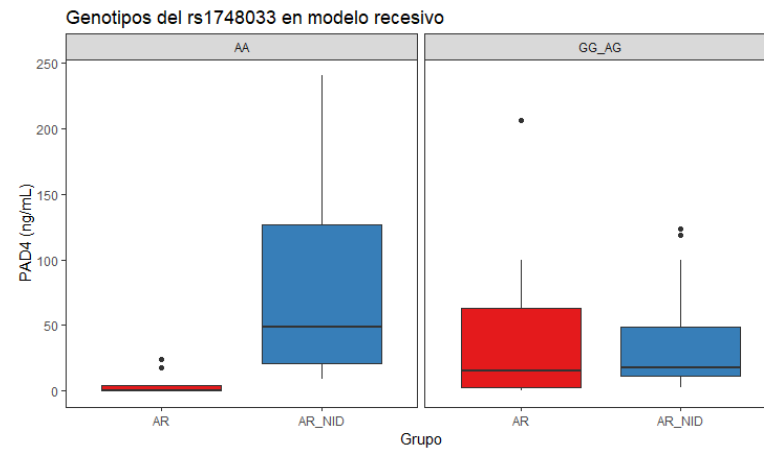
**Figura 22: Análisis de PAD2 en el modelo genético recesivo del rs2076615**



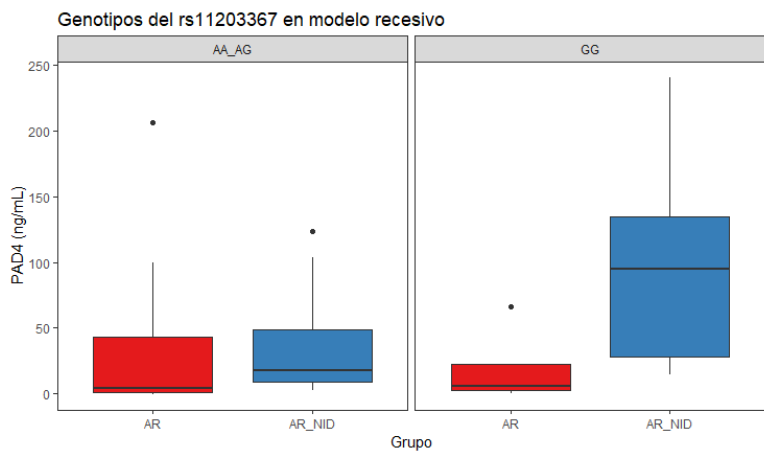
**Figura 23: Análisis de PAD2 en el modelo genético recesivo del rs1005753**



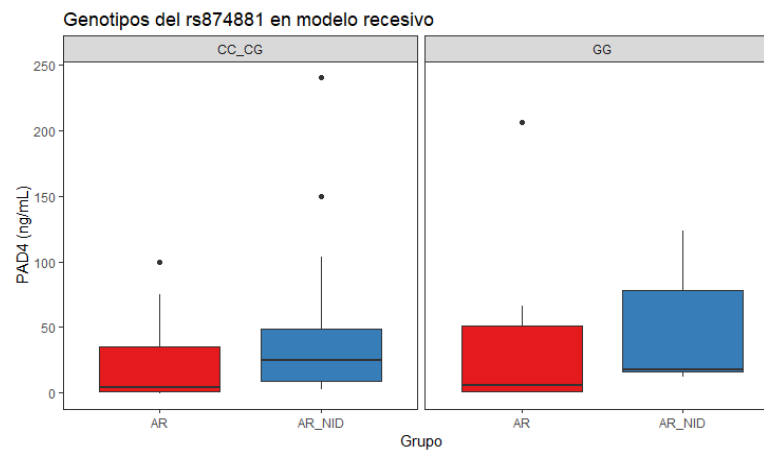
**Figura 24: Análisis de PAD4 en el modelo genético recesivo del rs11203366**



**Figura 26: Análisis de PAD4 en el modelo genético recesivo del rs1748033**



**Figura 25: Análisis de PAD4 en el modelo genético recesivo del rs11203367**



**Figura 27: Análisis de PAD4 en el modelo genético recesivo del rs874881**

---

---

### **Análisis de correlación de PAD2 y PAD4 en suero y LBA**

Se realizó un análisis de correlación de las proteínas PAD2 y PAD4 determinadas en suero y LBA de 22 pacientes con AR-NID. Se muestra en la figura 28 los valores de  $r^2$  obtenidos de cada una de las correlaciones con las principales variables que son tomadas en el diagnóstico de la artritis reumatoide y la neumopatía intersticial difusa.

Se obtuvo una  $r^2=0.92$  ( $p>0.001$ ) en la correlación de FEV<sub>1</sub>-FVC (figura 29), y correlaciones negativas de PAD2 en suero con las pruebas de función pulmonar (FEV<sub>1</sub> y FVC),  $r^2= -0.3$ .

En las correlaciones con PAD4 en suero, se obtuvieron correlaciones positivas con el factor reumatoide (FR) y la proteína C reactiva (PCR),  $r^2= 0.3$ .

### **Análisis de correlación de SNP y proteínas PAD2 y PAD4**

Se llevó a cabo un análisis de correlación entre PAD2 en lavado broncoalveolar y PAD2 en suero de 22 individuos diagnosticados con artritis reumatoide y neumopatía intersticial difusa, así como en PAD4 en suero y LBA, estos niveles de PAD se analizaron dependiendo del genotipo que presentaba cada individuo, se obtuvieron valores de correlación de  $r^2<0.4$ , de los cuales solo fueron significativos el rs11203366-AA con una  $r^2=0.56$ ,  $p=0.042$  y el rs11203367-GG  $r^2=0.53$ ,  $p=0.043$  (figuras 30 a 36).

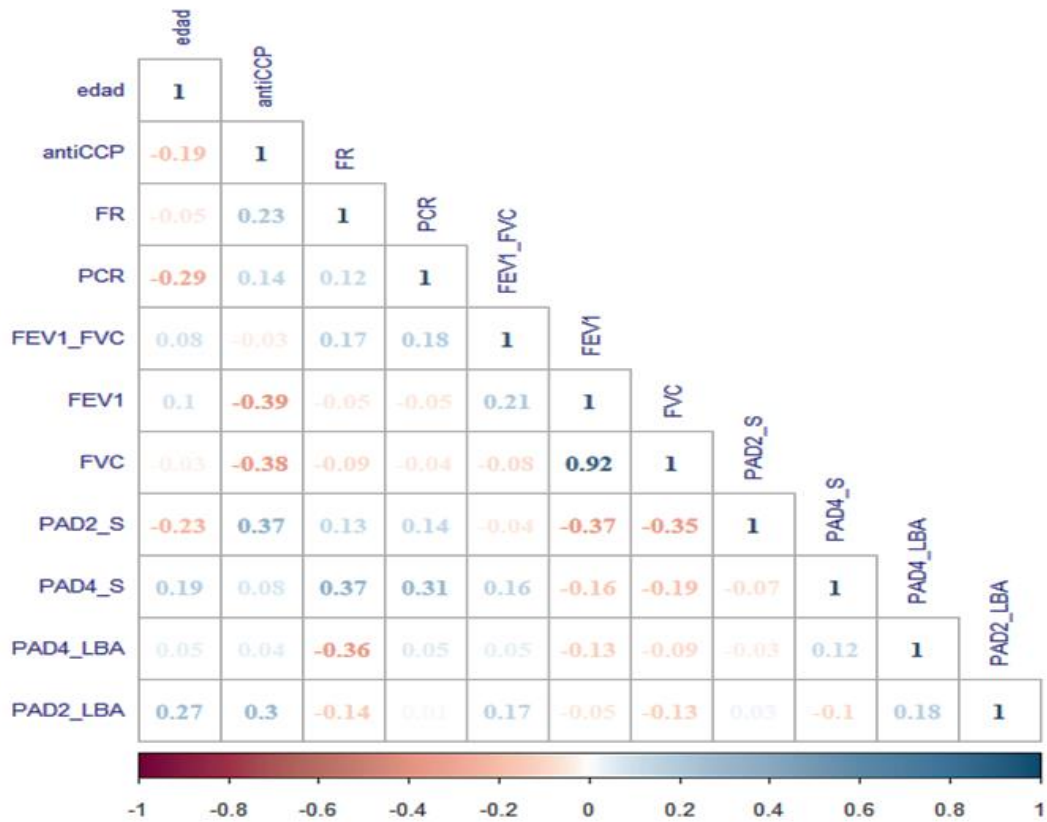


Figura 28: Gráfico de correlación de PAD2 y PAD4 en suero y LBA con variables clínicas

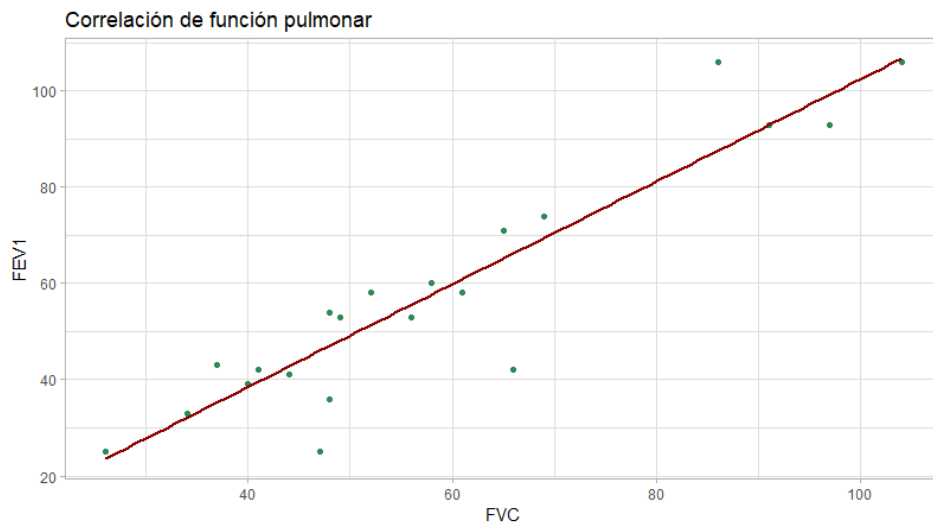
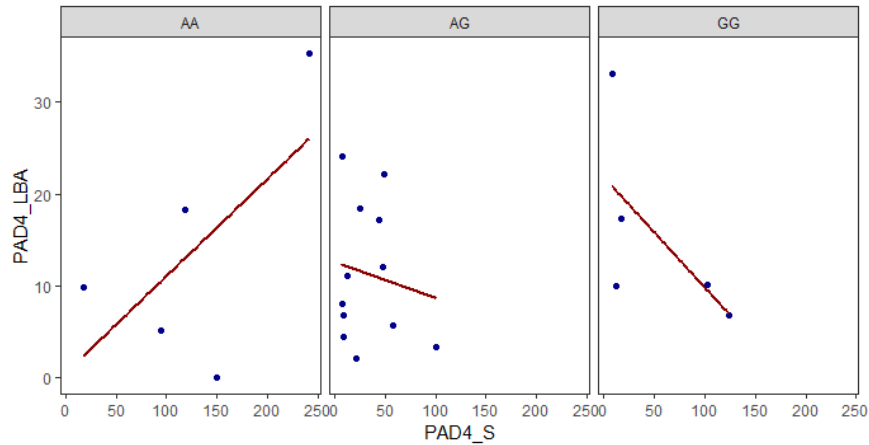
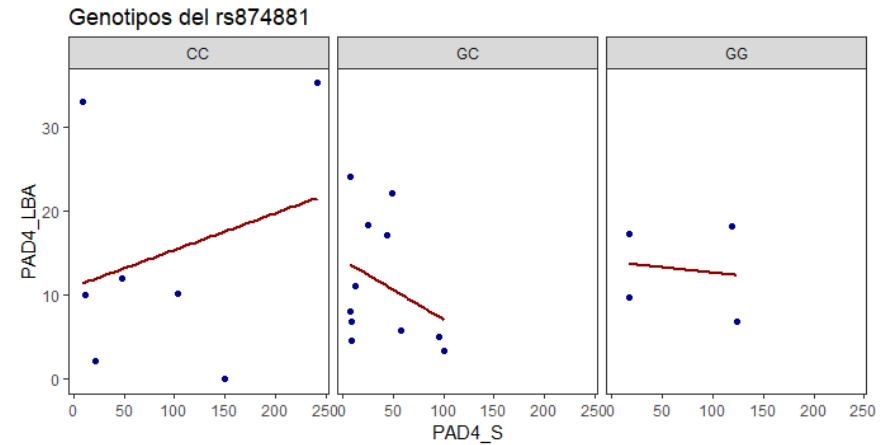


Figura 29 Correlación de FEV1, FVC con un  $r^2=0.9$  y un valor de  $p=0.0001$

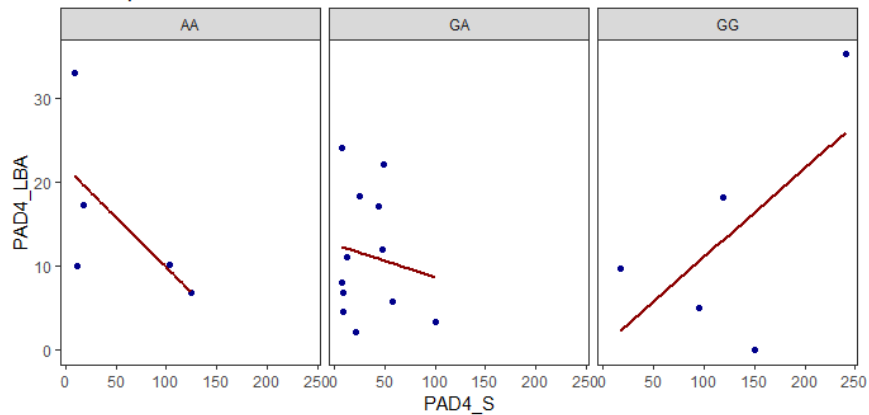




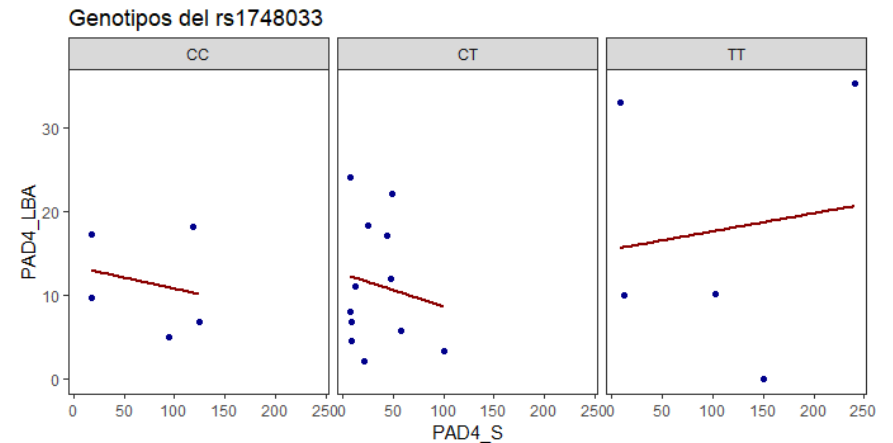
**Figura 33:** Correlación de PAD4 en suero y LBA dependiente de los genotipos del rs11203366. El valor de  $r^2 < 0.4$ ,  $p > 0.05$  en los genotipos AG y GG, mientras que el genotipo AA se obtuvo una  $r^2 = 0.56$ ,  $p = 0.042$ .



**Figura 35:** Correlación de PAD4 en suero y LBA dependiente de los genotipos del rs874881. El valor de  $r^2 < 0.4$ ,  $p > 0.05$ .



**Figura 34:** Correlación de PAD4 en suero y LBA dependiente de los genotipos del rs11203367. El valor de  $r^2 < 0.4$ ,  $p > 0.05$  en los genotipos AA y AG, mientras que el genotipo GG  $r^2 = 0.53$ ,  $p = 0.043$ .



**Figura 36:** Correlación de PAD4 en suero y LBA dependiente de los genotipos del rs1748033. El valor de  $r^2 < 0.4$ ,  $p > 0.05$ .

## 9) Discusión

Este estudio demuestra por primera vez la participación de polimorfismos genéticos en la susceptibilidad a desarrollar Neumopatía Intersticial Difusa (NID) en individuos con Artritis Reumatoide (AR), así como el incremento en los niveles de PAD4 en sujetos con alelos de riesgo en los genes que codifican a esta enzima.

Estudios epidemiológicos han demostrado que la NID es más frecuente en hombres,<sup>90</sup> mientras que la AR e lo es en mujeres,<sup>13</sup> en nuestro grupo de participantes fue más frecuente la presencia de AR-NID entre mujeres, pero se presenta mayor severidad en hombres.

También se ha reportado que la edad en la que se presentan estas enfermedades y el pronóstico en cada uno de ellos es variable. En Estados Unidos (*Department of Health and Human Services*) se reportó que el 68% de individuos mayores a 65 años que tienen enfermedad pulmonar intersticial son hombres,<sup>7</sup> en nuestros grupos de estudio se observó la NID en individuos con AR hombres en un 29.92%, mientras que en individuos con AR fue del 6.25%.

Se han propuesto distintos mecanismos tratando de explicar el desarrollo de enfermedades pulmonares en individuos con AR, además de sexo masculino, y la generación de autoanticuerpos (ACPA), otros factores de riesgo descritos son los ambientales como el tabaquismo, y genéticos como variaciones en genes de la región HLA.

---

---

La generación de autoanticuerpos aun es un tema no muy descrito, se han reportado niveles de citocinas similares entre los pacientes con autoanticuerpos positivos vs. Negativos, sin embargo, en individuos con AR la interleucina IL-6 se encontró incrementada (4 veces más) en individuos con anti-CCP positivos.<sup>62</sup>

Empleando un modelo experimental se ha descrito incremento en la respuesta de los ACPA (mecanismo hapteno- proteínas citrulinadas-/ acarreador), sin embargo, se desconoce su mecanismo de producción, algunos autores sugieren que los alelos HLA-DR se unen a péptidos citrulinados en los que intervienen las PAD2 y 4, los cuales posteriormente son reconocidos por células T, produciendo los ACPA, los cuales son detectados mediante anti-CCP en suero de los individuos.<sup>91</sup>

Por otro lado, se observó la presencia de autoanticuerpos (anti-PAD4 y anti-CCP) con un seguimiento desde un periodo preclínico, los cuales podían incrementar con el tiempo.<sup>64</sup>

En nuestra población de estudio, aproximadamente 45% de individuos AR-NID tienen anti-CCP positivos, y un 52% de individuos con AR son positivos para anti-CCP. Los niveles de anti-CCP en individuos con AR (259 U/mL) se ven incrementados en comparación con los niveles del grupo de AR-NID (~77 U/mL).

Con respecto a los factores ambientales, el tabaquismo es uno de los factores más estudiados, descrito en la susceptibilidad y en el desarrollo de enfermedades pulmonares como la NID y enfermedades autoinmunes, entre las que se encuentra la AR, sin embargo, se ha reportado que hasta 60% de individuos con neumopatía intersticial son “nunca fumadores”, lo que sugiere la existencia de otras exposiciones



---

---

a factores ambientales u ocupacionales que están participando en el desarrollo de estas enfermedades.<sup>7</sup>

En nuestra población, los principales factores de riesgo ambientales a los que se exponen los individuos fueron: 1) Tabaquismo en ~25% de individuos con AR-NID, y en menor porcentaje en individuos con AR (12.5%). En donde por frecuencia se observa que mayor número de individuos fumadores puede presentar una enfermedad pulmonar intersticial. 2) Exposición al humo de leña, el 24.41% de individuos con AR-NID y 12.5% de individuos con AR. Y 3) en menor proporción se encuentran exposiciones a aves, petróleo, carbón y a factores ocupacionales. Sin embargo, cerca del 22% y 62% de individuos con AR-NID y AR respectivamente, no presentan exposición a factores ambientales de riesgo, lo que demuestra la complejidad de estas enfermedades.

Por otro lado, se ha propuesto que la sobrerregulación de las PAD (que confiere el tabaquismo) en conjunto a la actividad catalítica proporcionada por autoanticuerpos generados (como los anti-PAD3/4XR) provee un estímulo potenciador al efecto que ejercen estas patologías.<sup>92</sup>

En la etapa erosiva de la enfermedad, se reporta que los autoanticuerpos anti-PAD3/4XR fueron detectados en pacientes con AR, asociados a la presencia de enfermedad pulmonar intersticial (detectada por imagenología), además, la combinación de tabaquismo con PAD3/4XR positivos fue asociado con alta frecuencia de enfermedad pulmonar intersticial, lo que sugiere un efecto sinérgico

---

---

o potenciador que podría explicar parte del mecanismo fisiopatológico de estas enfermedades complejas.<sup>92</sup>

Badillo-Soto y colaboradores identificaron que la expresión de PAD2 y PAD4 es exclusivo en pacientes con AR.<sup>61</sup>, en los grupos de estudio se encontraron incrementadas (con respecto a los niveles reportados como “normales”). PAD2 se encuentra incrementada en individuos con AR, sin embargo, no existe una variación en el grupo de AR-NID, ya que son similares a los valores obtenidos en el grupo de individuos clínicamente sanos.

Por otro lado, PAD4 en suero se encuentra incrementado en el grupo de AR-NID (8.65 ng/mL), en el grupo de AR es de 7.9 y en CS la mediana es de 1.05 U/mL, resulta interesante que los niveles en LBA (>10 U/mL) también se encuentran elevados a diferencia de la cuantificación con PAD2 que fue indetectable en algunos individuos.

Se ha reportado la interacción de factores ambientales y genéticos, como los anteriormente mencionados, además SNP en genes que codifican a las enzimas PAD, en donde observaron SNP en PADI4 que predisponen a hombres fumadores a desarrollar artritis reumatoide.<sup>38</sup>

También se observaron polimorfismos en la región intergénica entre *PADI3* y *PADI4* que se encuentran asociados al desarrollo de AR, los cuales están relacionados adicionalmente con la citrulinación de histonas, lo que sugiere que estos polimorfismos tienen un rol importante entre la deiminación y la posterior generación de ACPA.<sup>93</sup>

---

---

Se identificaron múltiples sitios de citrulinación en PAD4 (Arg-372 y Arg-374, los cuales se encuentran en el sitio de reconocimiento al sustrato <sup>94</sup>) como blancos potenciales de autocitrulinación que inactivan a la enzima, la cual modifica la estructura de PAD4 aumentando el reconocimiento por los anticuerpos humanos, afectando así la interacción enzima-sustrato.

La citrulinación en el sitio de Arg-372 y Arg-374, pueden explicar una inactivación de PAD4, en este cambio se conserva el aminoácido lisina en esta posición, sin embargo, es removido el grupo guanidinio durante la citrulinación, lo cual modifica esta afinidad.<sup>35</sup>

Distintos autores sugieren que la autocitrulinación regula la producción de proteínas citrulinadas durante la activación celular, y esto se encuentra afectado por polimorfismos en *PADI4*, donde tiene un papel importante tanto su estructura como la respuesta inmunológica.<sup>35</sup>

Se estudiaron 8 polimorfismos en los genes *PADI2* y *PADI4* que previamente se habían asociado a AR y/o a NID. En *PADI2* el rs1005753 se encontró asociado el alelo T a menor riesgo de padecer AR en poblaciones asiáticas, y el rs2057094-A, con un incremento en la susceptibilidad a padecer AR, <sup>50,67</sup> en nuestra población de estudio, el rs1005753-GG presenta un OR=4.91 ( $p=0.012$ ), y el rs2057094-TT un OR=1.71 ( $p=0.005$ ), los cuales se encuentran asociados a mayor susceptibilidad a presentar una NID en individuos con AR. Por otro lado, el rs2076615-CC se encuentra asociado a menor riesgo a NID en individuos con AR.

---

---

En *PADI4* se han descrito y replicado distintos polimorfismos y haplotipos (formados por los mismos SNP) en distintas poblaciones: india<sup>76</sup>, sueca<sup>93</sup>, mexicana<sup>95,96</sup>, china<sup>97-99</sup>, francesa<sup>74</sup>, y coreana<sup>84,100</sup> en donde se han observado asociados a AR.

En nuestro estudio, el genotipo AA del rs11203366 (OR=3.08, p=0.004), rs11203367-GG (OR=2.4, p=0.023) y el rs874881-GG (OR=2.53, p=0.003) se asocian con susceptibilidad a neumopatía intersticial difusa en individuos con artritis reumatoide. Y el rs1748033-A con OR=1.7 a susceptibilidad a AR en la comparación con sujetos CS.

Bang y colaboradores describen la participación de polimorfismos presentes en *PADI4*, los cuales están asociados con susceptibilidad a AR, e interacciones entre homocigotos al haplotipo GTG (*PADI4*\_89, 90 y 92) de SNP en *PADI4* y el alelo HLA-DRB1 epítipo compartido (SE), los cuales se relacionan con la producción de anti-CCP, así como a tabaquismo y a la presencia de enfermedad erosiva de los mismos pacientes.<sup>100</sup>

Este haplotipo se ha descrito de susceptibilidad a desarrollar AR en individuos fumadores con ACPA positivos y alelos HLA positivos con SE.<sup>68,100</sup> Sumando el riesgo que tiene cada uno de los SNP de manera individual, estos SNP tienen un desequilibrio de ligamiento alto, descrito en distintas poblaciones.

En nuestro grupo de estudio se obtuvo el haplotipo GACA (OR=1.395, p=0.004) de susceptibilidad a NID en individuos con AR, y el AGGA (OR=0.116, p=0.009) asociado a menor riesgo a NID en individuos con AR. Los haplotipos obtenidos tienen un alto desequilibrio de ligamiento, con un valor de  $r^2 \geq 0.80$ .

---

---

Como ya se mencionó anteriormente, la citrulinación de proteínas es llevada a cabo por las enzimas PAD, la cual se encuentra desregulada en los individuos con AR incrementando los niveles de estas proteínas. Se ha descrito que incrementan su función con un incremento de calcio, sin embargo, puede estar inducida por proteínas con un papel similar al calcio para abrir canales/poros y aumentar las concentraciones induciendo así el incremento en la actividad de las enzimas PAD.<sup>101</sup>

En AR se ha descrito que PAD2 y PAD4 se ven expresadas en macrófagos sinoviales y leucocitos,<sup>40,102-105</sup> además se ha descrito en la exacerbación de inflamación en pulmones en modelo animal, en donde PAD4 contribuye a TNF- $\alpha$  con la inflamación en articulaciones.<sup>106</sup>

Tomando en cuenta las proteínas PAD2 y PAD4, dependiendo de los polimorfismos presentes en los genes que las codifican y los factores de riesgo (exposiciones ambientales) de los individuos con las enfermedades se observó que los niveles de PAD2 se encuentran incrementados en individuos con AR y en individuos fumadores con >10 ng/mL en ambos grupos.

Los niveles de PAD4 en individuos CS son menores a 10 ng/mL independientemente de su exposición a factores de riesgo, sin embargo, en los individuos con AR que se exponen al humo de leña los niveles son de ~50 ng/mL y en el grupo de AR-NID de 2 ng/mL.

En el caso de los individuos con tabaquismo, los niveles de PAD4 en el grupo de AR son de 3 ng/mL y en AR-NID de 30 ng/mL. Esto que indica que los niveles de

---

---

PAD dependientes de las exposiciones a distintos factores de riesgo son muy variables, sin embargo, se observa que los niveles de PAD4 incrementan en individuos fumadores con AR-NID y PAD2 se encuentra incrementada en individuos con AR.

Adicionalmente, los niveles de PAD4 se encuentran incrementados en individuos con AR-NID que tienen el genotipo AA del rs11203366, este efecto del polimorfismo se puede observar con el modelo recesivo, asociado a un incremento en la susceptibilidad a NID.

Con el tiempo se permitirán realizar comparaciones más fiables de la incidencia y la prevalencia de estas enfermedades, y también se facilitarán los estudios que se lleven a cabo en el futuro para determinar el rendimiento de las técnicas diagnósticas existentes.

---

---

10) Conclusiones

Los polimorfismos rs11203366, rs11203367, rs874881 en *PADI4* y rs1005753 en *PADI2*, se encuentran asociados al desarrollo de NID en pacientes con AR, los cuales modifican los niveles de PAD4 en suero de pacientes con AR-NID.

No existe una correlación entre los niveles de PAD2 y PAD4 en suero y LBA.

Los polimorfismos rs1748033 en *PADI4*, rs2057094 y rs2076615 en *PADI2* se encuentran asociados al desarrollo de AR, pero no a NID.

---

---

11) Referencias bibliográficas

1. Vereza Hernando H, Otero González I. *Neumopatías por fármacos*. First Edic. Elsevier B.V.; 2010. doi:10.1016/B978-84-8086-298-1.50077-9.
2. Iturbe Fernández D, Peris Sánchez R, Ferreira Moreno A, Fernández, Fabrellas E. Aspectos relevantes en el manejo de la enfermedad pulmonar intersticial difusa. *Arch Bronconeumol*. 2009;45(Supl 3):3–8. doi:10.1016/S0300-2896(09)72851-0.
3. Disdier C, Pérez-Negrín L, Morales P, Cordovilla R. Revista del año 2009 en neumología intervencionista, enfermedades intersticiales y trasplante. *Arch Bronconeumol*. 2010;46(Supl 1):33–37. doi:10.1016/S0300-2896(10)70009-0.
4. Cano-Jiménez E, Molina-Molina M, Ramírez J, Aliaga JL, Sánchez M, Xaubet A. Diffuse Interstitial Lung Disease Related to Peribronchiolar Metaplasia. *Arch Bronconeumol*. 2009;45(1):57–59. doi:10.1016/S1579-2129(09)71789-6.
5. Furukawa H, Oka S, Shimada K, et al. Autoantibody profiles in collagen disease patients with interstitial lung disease (ILD): Antibodies to major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) as markers of ILD. *Biomark Insights*. 2015;10:63–73. doi:10.4137/BMI.S28209.
6. Lynch DA. Lung disease related to collagen vascular disease. *J Thorac Imaging*. 2009;24(4):299–309. doi:10.1097/RTI.0b013e3181c1acec.
7. Patterson KC, Shah RJ, Porteous MK, et al. Interstitial Lung Disease in the Elderly. *Chest*. 2017;151(4):838–844. doi:10.1016/j.chest.2016.11.003.
8. Mir AX, Jiménez EC, Xaubet Mir A, Cano Jiménez E. *Enfermedades pulmonares intersticiales difusas: etiología, clasificación y aproximación diagnóstica*. First Edic. Elsevier B.V.; 2010. doi:10.1016/B978-84-8086-298-



---

---

1.50006-8.

9. Joo HP, Dong SK, Park IN, et al. Prognosis of fibrotic interstitial pneumonia: Idiopathic versus collagen vascular disease-related subtypes. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(7):705–711. doi:10.1164/rccm.200607-912OC.
10. Kim EJ, Elicker BM, Maldonado F, et al. Usual interstitial pneumonia in rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease. *Eur Respir J.* 2010;35(6):1322–1328. doi:10.1183/09031936.00092309.
11. Paulin F, Doyle TJ, Fletcher EA, Ascherman DP, Rosas IO. Rheumatoid Arthritis-associated Interstitial Lung Disease and Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Shared mechanistic and phenotypic traits suggest overlapping disease mechanisms. *Rev Invest Clin.* 2015;67(5):280–286.
12. McInnes Iain B. SG. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2011;365(23):2205–2219.
13. 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 COPCORD methodology. *J Rheumatol.* 2011;38(SUPPL. 86):3–6. doi:10.3899/jrheum.101024.
14. Di Sante G, Tolusso B, Fedele ALA, et al. Collagen Specific T-Cell Repertoire and HLA-DR Alleles: Biomarkers of Active Refractory Rheumatoid Arthritis. *EBIOM.* 2015;2(12):2037–2045. doi:10.1016/j.ebiom.2015.11.019.
15. Chemin K, Pollastro S, James E, et al. A Novel HLA-DRB1\*10:01-Restricted T Cell Epitope from Citrullinated Type II Collagen Relevant to Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(5). doi:10.1002/art.39553.
16. Wegner N, Lundberg K, Kinloch A, et al. Autoimmunity to specific citrullinated proteins gives the first clues to the etiology of rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2010;233(1):34–54. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00850.x.

17. Plenge RM, Padyukov L, Remmers EF, et al. Replication of putative candidate-gene associations with rheumatoid arthritis in >4,000 samples from North America and Sweden: association of susceptibility with PTPN22, CTLA4, and PADI4. *Am J Hum Genet.* 2005;77(6):1044–1060.  
doi:10.1086/498651.
18. Costenbader KH, Karlson EW. Cigarette smoking and autoimmune disease: what can we learn from epidemiology? *Lupus.* 2006;15(11):737–745.  
doi:10.1177/0961203306069344.
19. Brusca SB, Abramson SB, Scher JU. Microbiome and mucosal inflammation as extra-articular triggers for rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Curr Opin Rheumatol.* 2015;26(1):101–107.  
doi:10.1097/BOR.0000000000000008.Microbiome.
20. Goulas T, Mizgalska D, Garcia-ferrer I, et al. Structure and mechanism of a bacterial host-protein citrullinating virulence factor, Porphyromonas gingivalis peptidylarginine deiminase. *Nat Sci reports.* 2015;5:1–17.  
doi:10.1038/srep11969.
21. Pyrc K, Milewska A, Kantyka T, et al. Inactivation of Epidermal Growth Factor by Porphyromonas gingivalis as a Potential Mechanism for Periodontal Tissue Damage. *Infect Immun.* 2013;81(1):55–64.  
doi:10.1128/IAI.00830-12.
22. Maresz KJ, Hellvard A, Sroka A, et al. Porphyromonas gingivalis Facilitates the Development and Progression of Destructive Arthritis through Its Unique Bacterial Peptidylarginine Deiminase (PAD). *PLoS Pathol.* 2013;9(9):1–10.  
doi:10.1371/journal.ppat.1003627.
23. Engdahl C, Börjesson AE, Forsman HF, et al. The role of total and cartilage-specific estrogen receptor alpha expression for the ameliorating effect of estrogen treatment on arthritis. *Arthritis Res.* 2014;16(R150):1–11.  
doi:10.1186/ar4612.

24. Roman-Blas JA, Castañeda S, Largo R, Herrero-Beaumont G. Osteoarthritis associated with estrogen deficiency. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:1–14. doi:10.1186/ar2791.
25. 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;95:2672–2679. doi:10.1172/JCI117969.
26. Damoiseaux J, Andrade LE, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibodies 2015: From diagnostic biomarkers toward prediction, prognosis and prevention. *Autoimmun Rev.* 2015;14(6):555–563. doi:10.1016/j.autrev.2015.01.017.
27. Ingegnoli F, Castelli R, Gualtierotti R. Rheumatoid factors: Clinical applications. *Dis Markers.* 2013. doi:10.1155/2013/726598.
28. van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: a prospective cohort study. *Arthritis Rheum.* 2004;50(3):709–715. doi:10.1002/art.20044.
29. Vossenaar ER, Després N, Lapointe E, et al. Rheumatoid arthritis specific anti-Sa antibodies target citrullinated vimentin. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(2):142–150. doi:10.1186/ar1149.
30. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 2003;423(6937):356–361. doi:10.1038/nature01661.
31. Vossenaar ER, Zendman AJW, van Venrooij WJ, Pruijn GJM. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays.* 2003;25(11):1106–1118. doi:10.1002/bies.10357.
32. Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren A-K, et al. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis.* 2008;67:1488–1492. doi:10.1136/ard.2007.075192.

33. 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(1):38–46. doi:10.1002/art.21575.
34. Suzuki A, Kochi Y, Shoda H, et al. Decreased severity of experimental autoimmune arthritis in peptidylarginine deiminase type 4 knockout mice. *BMC Musculoskelet Disord.* 2016;17(205):1–15. doi:10.1186/s12891-016-1055-2.
35. Andrade F, Darrah E, Gucek M, Cole RN, Rosen A, Zhu X. Autocitrullination of human peptidyl arginine deiminase type 4 regulates protein citrullination during cell activation. *Arthritis Rheum.* 2010;62(6):1630–1640. doi:10.1002/art.27439. Autocitrullination.
36. Cappelli LC, Konig MF, Gelber AC, Iii COB, Darrah E. Smoking is not linked to the development of anti-peptidylarginine deiminase 4 autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2018;20(59):1–8.
37. Alsalahy MM, Nasser HS, Hashem MM, Elsayed SM. Effect of tobacco smoking on tissue protein citrullination and disease progression in patients with rheumatoid arthritis. *Saudi Pharm J.* 2010;18(2):75–80. doi:10.1016/j.jsps.2010.02.002.
38. Kochi Y, Thabet MM, Suzuki A, et al. PADI4 polymorphism predisposes male smokers to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(3):512–515. doi:10.1136/ard.2010.130526.
39. Dreyton CJ, Knuckley B, Jones JE, Lewallen DM, Thompson PR. Mechanistic studies of protein arginine deiminase 2: evidence for a substrate-assisted mechanism. *Biochemistry.* 2014;53(27):4426–4433. doi:10.1021/bi500554b.
40. Anzilotti C, Pratesi F, Tommasi C, Migliorini P. Peptidylarginine deiminase 4

---

---

and citrullination in health and disease. *Autoimmun Rev.* 2010;9(3):158–160. doi:10.1016/j.autrev.2009.06.002.

41. Arandjelovic S, McKenney KR, Leming SS, Mowen KA. ATP induces protein arginine deiminase 2-dependent citrullination in mast cells through the P2X7 purinergic receptor. *J Immunol.* 2012;189(8):4112–4122. doi:10.4049/jimmunol.1201098.
42. van Venrooij WJ, Pruijn GJ. Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2000;2(4):249–251. doi:10.1186/ar95.
43. Tarcsa E, Marekov LN, Mei G, Melino G, Lee SC, Steinert PM. Protein unfolding by peptidylarginine deiminase: Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J Biol Chem.* 1996;271(48):30709–30716. doi:10.1074/jbc.271.48.30709.
44. Dong S, Ying S, Kojima T, et al. Crucial roles of MZF1 and Sp1 in the transcriptional regulation of the peptidylarginine deiminase type I gene (PADI1) in human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2008;128(3):549–557. doi:10.1038/sj.jid.5701048.
45. Lewis HD, Liddle J, Coote JE, et al. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nat Chem Biol.* 2015;11(3):189–191. doi:10.1001/jamapsychiatry.2014.2671.A.
46. Nakashima K, Arai S, Suzuki A, et al. PAD4 regulates proliferation of multipotent haematopoietic cells by controlling c-myc expression. *Nat Commun.* 2013;4(May):1836. doi:10.1038/ncomms2862.
47. Nakashima K, Hagiwara T, Yamada M. Nuclear Localization of Peptidylarginine Deiminase V and Histone Deimination in Granulocytes. *J Biol Chem.* 2002;277(51):49562–49568. doi:10.1074/jbc.M208795200.
48. Jang B, Ishigami A, Maruyama N, Carp RI, Kim Y-S, Choi E-K.

---

---

Peptidylarginine deiminase and protein citrullination in prion diseases: strong evidence of neurodegeneration. *Prion*. 7(1):42–46. doi:10.4161/pri.22380.

49. György B, Tóth E, Tarcsa E, Falus A, Buzás EI. Citrullination: A posttranslational modification in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(10):1662–1677. doi:10.1016/j.biocel.2006.03.008.
50. Too CL, Murad S, Dhaliwal JS, et al. Polymorphisms in peptidylarginine deiminase (PADI) associate with rheumatoid arthritis in diverse Asian populations: evidence from MyEIRA study and meta-analysis. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(6):R250. doi:10.1186/ar4093.
51. Iida A, Nakamura Y. Identification of 45 novel SNPs in the 83-kb region containing peptidylarginine deiminase types 1 and 3 loci on chromosomal band 1p36.13. *J Hum Genet*. 2004;49(7):387–390. doi:10.1007/s10038-004-0156-1.
52. Ramírez-Bello J, Vargas-Alarcón G, Tovilla-Zárate C, Fragoso JM. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): Implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gac Med Mex*. 2013;149:220–228.
53. Jones JE, Causey CP, Knuckley B, Slack-Noyes JL, Thompson PR. Protein arginine deiminase 4 (PAD4): Current understanding and future therapeutic potential. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2009;12(5):616–627.
54. Teo CY, Shave S, Chor ALT, et al. Discovery of a new class of inhibitors for the protein arginine deiminase type 4 (PAD4) by structure-based virtual screening. *BMC Bioinformatics*. 2012;13 Suppl 1(Suppl 17):S4. doi:10.1186/1471-2105-13-S17-S4.
55. Liu Y-L, Tsai I-C, Chang C-W, Liao Y-F, Liu G-Y, Hung H-C. Functional Roles of the Non-Catalytic Calcium-Binding Sites in the N-Terminal Domain of Human Peptidylarginine Deiminase 4. *PLoS One*. 2013;8(1):e51660.

---

---

doi:10.1371/journal.pone.0051660.

56. Nachat R, Méchin MC, Takahara H, et al. Peptidylarginine deiminase isoforms 1-3 are expressed in the epidermis and involved in the deimination of K1 and filaggrin. *J Invest Dermatol.* 2005;124:384–393.  
doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23568.x.
57. Méchin MC, Enji M, Nachat R, et al. The peptidylarginine deiminases expressed in human epidermis differ in their substrate specificities and subcellular locations. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(17):1984–1995.  
doi:10.1007/s00018-005-5196-y.
58. Shaw M, Collins BF, Ho LA, Raghu G. Rheumatoid arthritis-associated lung disease. *Eur Respir Rev.* 2015;24(135):1–16.  
doi:10.1183/09059180.00008014.
59. Harlow L, Gochuico BR, Rosas IO, et al. Anti-citrullinated heat shock protein 90 antibodies identified in bronchoalveolar lavage fluid are a marker of lung-specific immune responses. *Clin Immunol.* 2015;155(1):60–70.  
doi:10.1016/j.clim.2014.08.004.Anti-citrullinated.
60. Lugli EB, Correia RESM, 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. doi:10.1186/s13075-015-0520-x.
61. Badillo-Soto MA, Rodríguez-Rodríguez M, Pérez-Pérez ME, et al. Potential protein targets of the peptidylarginine deiminase 2 and peptidylarginine deiminase 4 enzymes in rheumatoid synovial tissue and its possible meaning. *Eur J Rheumatol.* 2016;3:44–49.  
doi:10.5152/eurjrheum.2015.0055.
62. Damgaard D, Senolt L, Nielsen CH. Increased levels of peptidylarginine deiminase 2 in synovial fluid from anti-CCP-positive rheumatoid arthritis

---

---

patients : Association with disease activity and inflammatory markers.

*Rheumatology*. 2016;55(February):918–927.

doi:10.1093/rheumatology/kev440.

63. Shelf MA, Sokolove J, Lahey LJ, et al. Peptidylarginine Deiminase 4 Contributes to Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -Induced Inflammatory Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(6):1482–1491.  
doi:10.1021/ja8019214.Optimization.
64. Kolfenbach JR, Deane KD, Derber LA, et al. Autoimmunity to Peptidyl Arginine Deiminase Type 4 Precedes Clinical Onset of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(9):2633–2639.  
doi:10.1002/art.27570.Autoimmunity.
65. Basmanav Ü, Buket F, Cau L, et al. Mutations in Three Genes Encoding Proteins Involved in Hair Shaft Formation Cause Uncombable Hair Syndrome. *Am J Hum Genet*. 2016;99(6):1292–1304.  
doi:10.1016/j.ajhg.2016.10.004.
66. Lim M-K, Shim TS, Park M, et al. Heterozygote genotypes for PADI4\_89 were protectively associated with susceptibility to tuberculosis in Koreans. *Rheumatol Int*. 2014;35(4):1–5. doi:10.1007/s00296-014-3119-7.
67. Chang X, Xia Y, Pan J, Meng Q, Zhao Y, Yan X. PADI2 Is Significantly Associated with Rheumatoid Arthritis. *PLoS One*. 2013;8(12):e81259.  
doi:10.1371/journal.pone.0081259.
68. Suzuki A, Yamada R, Chang X, et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet*. 2003;34(4):395–402.  
doi:10.1038/ng1206.
69. Barton A, Bowes J, Eyre S, et al. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population is not



---

---

associated in a United Kingdom population. *Arthritis Rheum.* 2004;50(4):1117–1121. doi:10.1002/art.20169.

70. Harney SMJ, Meisel C, Sims a-M, Woon PY, Wordsworth BP, Brown M a. Genetic and genomic studies of PADI4 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44(October 2004):869–872. doi:10.1093/rheumatology/keh614.
71. Ikari K, Kuwahara M, Nakamura T, et al. Association between PADI4 and rheumatoid arthritis: a replication study. *Arthritis Rheum.* 2005;52(10):3054–3057. doi:10.1002/art.21309.
72. Kang CP, Lee HS, Ju H, Cho H, Kang C, Bae SC. A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans. *Arthritis Rheum.* 2006;54(1):90–96. doi:10.1002/art.21536.
73. Hoppe B, Häupl T, Gruber R, et al. Detailed analysis of the variability of peptidylarginine deiminase type 4 in German patients with rheumatoid arthritis: a case-control study. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(2):R34. doi:10.1186/ar1889.
74. Gandjbakhch F, Fajardy I, Ferré B, et al. A functional haplotype of PADI4 gene in rheumatoid arthritis: positive correlation in a French population. *J Rheumatol.* 2009;36(5):881–886. doi:10.3899/jrheum.080398.
75. Hashemi M, Zakeri Z, Taheri H, Bahari G, Taheri M. Association between Peptidylarginine Deiminase Type 4 rs1748033 Polymorphism and Susceptibility to Rheumatoid Arthritis in Zahedan, Southeast Iran. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2015;14(3):255–260. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26546893>. Consultado noviembre 9, 2015.
76. Panati K, Pal S, Rao K V, Reddy VD. Association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of PADI4 gene with rheumatoid arthritis (RA) in

---

---

Indian population. *Genes Genet Syst.* 2012;87(3):191–196.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22976394>. Consultado noviembre 9,  
2015.

77. Zavala-Cerna MG, Gonzalez-Montoya NG, Nava A, et al. PADI4 haplotypes in association with RA Mexican patients, a new prospect for antigen modulation. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013(1):383681.  
doi:10.1155/2013/383681.
78. Watanabe Y, Nunokawa A, Kaneko N, et al. Two-stage case-control association study of polymorphisms in rheumatoid arthritis susceptibility genes with schizophrenia. *J Hum Genet.* 2009;54(1):62–65.  
doi:10.1038/jhg.2008.4.
79. Lee H, Kim DS, Yoo B. Histopathologic Pattern and Clinical Features of Rheumatoid Arthritis- Associated Interstitial Lung Disease. *Chest.* 2005;(6):2019–2027.
80. Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM, et al. Survival in rheumatoid arthritis: A population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis Rheum.* 2003;48(1):54–58. doi:10.1002/art.10705.
81. 5. doi:10.1007/s00296-004-0472-y. vement in rheumatoid arthritis. 25:429–435. doi:10.1007/s00296-004-0472-y.
82. Mori S, Cho I, Koga Y, Sugimoto M. Comparison of pulmonary abnormalities on high-resolution computed tomography in patients with early versus longstanding rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2008;35(8):1513–1521.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18597412>. Consultado mayo 17, 2017.
83. Dawson JK, Fewins HE, Desmond J, Lynch MP, Graham DR. Fibrosing alveolitis in patients with rheumatoid arthritis as assessed by high resolution computed tomography, chest radiography, and pulmonary function tests. *Thorax.* 2001;56(6):622–627.

---

---

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1746113/pdf/v056p00622.pdf>.  
Consultado mayo 17, 2017.

84. Cha S, Choi C-B, Han T-U, Kang CP, Kang C, Bae S-C. Association of Anti-Cyclic citrullinated peptide antibody levels with PADI4 haplotypes in early rheumatoid arthritis and with shared epitope alleles in very late rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007;56(5):1454–1463. doi:10.1002/art.22570.
85. Yunt ZX, Solomon JJ. Lung disease in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*. 2015;41(2):225–236. doi:10.1016/j.rdc.2014.12.004.
86. Schellekens GA, Visser H, De Jong BAW, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum*. 2000;43(1):155–163. doi:10.1002/1529-0131(200001)43:1<155::AID-ANR20>3.0.CO;2-3.
87. Chavanas S, Méchin MC, Takahara H, et al. Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segments and a new human gene, PADI6. *Gene*. 2004;330 (1-2). doi:10.1016/j.gene.2003.12.038.
88. Klareskog L, Rönnelid J, Lundberg K, Padyukov L, Alfredsson L. Immunity to Citrullinated Proteins in Rheumatoid Arthritis. *Annu Rev Immunol*. 2008;26(1):651–675. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090244.
89. Schellekens G a., De Jong B a W, Van Den Hoogen FHJ, Van De Putte LB a, Van Venrooij WJ. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest*. 1998;101(1):273–281. doi:10.1172/JCI1316.
90. Vaz Fragoso CA. Epidemiology of Lung Disease in Older Persons. *Clin Geriatr Med*. 2017:1–11. doi:10.1016/j.cger.2017.06.003.
91. Arnoux F, Mariot C, Peen E, et al. Peptidyl arginine deiminase immunization induces anticitrullinated protein antibodies in mice with particular MHC types.

---

---

*PNAS*. 2017;1–9. doi:10.1073/pnas.1713112114.

92. Giles JT, 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(6):e98794. doi:10.1371/journal.pone.0098794.
93. Johansson L, Pratesi F, Brink M, et al. Antibodies directed against endogenous and exogenous citrullinated antigens pre-date the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2016;18(127):1–11. doi:10.1186/s13075-016-1031-0.
94. Arita K, Shimizu T, Hashimoto H, Hidaka Y, Yamada M, Sato M. Structural basis for histone N-terminal recognition by human peptidylarginine deiminase 4. *PNAS*. 2006;103(14):5291–5296. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1459348/pdf/zpq5291.pdf>. Consultado abril 13, 2018.
95. Reyes-Castillo Z, Palafox-Sánchez CA, Parra-Rojas I, et al. Comparative analysis of autoantibodies targeting peptidylarginine deiminase type 4, mutated citrullinated vimentin and cyclic citrullinated peptides in rheumatoid arthritis : associations with cytokine profiles, clinical and genetic features. *Clin Exp Immunol*. 2015;182:119–131. doi:10.1111/cei.12677.
96. Guzmán-Guzmán IP, Reyes-Castillo Z, Muñoz-Barrios S, et al. Polymorphisms and functional haplotype in PADI4: Further evidence for contribution on rheumatoid arthritis susceptibility and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in a western Mexican population. *Immunol Lett*. 2015;163(2):214–220. doi:10.1016/j.imlet.2014.10.029.
97. Chen R, Wei Y, Cai Q, et al. The PADI4 gene does not contribute to genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in Chinese Han population. *Rheumatol Int*. 2011;31(12):1631–1634. doi:10.1007/s00296-010-1519-x.

- 
- 
98. Chang X, Jinxiang Han. Expression of Peptidylarginine Deiminase Type 4 (PAD4) in Various Tumors. *Mol Carcinog*. 2006;45:183–196. doi:10.1002/mc.
  99. Hancock DB, Artigas MS, Gharib S a, et al. Genome-wide joint meta-analysis of SNP and SNP-by-smoking interaction identifies novel loci for pulmonary function. *PLoS Genet*. 2012;8(12):e1003098. doi:10.1371/journal.pgen.1003098.
  100. Bang S-Y, Han T-U, Choi C-B, Sung Y-K, Bae S-C, Kang C. Peptidyl arginine deiminase type IV (PADI4) haplotypes interact with shared epitope regardless of anti-cyclic citrullinated peptide antibody or erosive joint status in rheumatoid arthritis: a case control study. *Arthritis Res Ther*. 2010;12:R115. doi:10.1186/ar3051.
  101. Romero V, Fert-bober J, Nigrovic PA, et al. Immune-mediated pore-forming pathways induce cellular hypercitrullination and generate citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*. 2014;5:1–27. doi:10.1126/scitranslmed.3006869.Immune-mediated.
  102. Foulquier C, Sebbag M, Clavel C, et al. 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*. 2007;56(11):3541–3553. doi:10.1002/art.22983.
  103. Migliorini P, Pratesi F, Tommasi C, Anzilotti C. The immune response to citrullinated antigens in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2005;4:561–564. doi:10.1016/j.autrev.2005.04.007.
  104. Sakkas LI, Bogdanos DP, Katsiari C, Platsoucas CD. Anti-citrullinated peptides as autoantigens in rheumatoid arthritis—relevance to treatment. *Autoimmun Rev*. 2014;13:1114–1120. doi:10.1016/j.autrev.2014.08.012.
  105. Sakkas LI, Daoussis D, Lioussis S-N, Bogdanos DP. The Infectious Basis of ACPA-Positive Rheumatoid Arthritis. *Front Microbiol*. 2017;8(1853):1–9.

---

---

doi:10.3389/fmicb.2017.01853.

106. Bawadekar M, Gendron-fitzpatrick A, Rebernick R, et al. Tumor necrosis factor alpha, citrullination, and peptidylarginine deiminase 4 in lung and joint inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2016;18(173):1–9. doi:10.1186/s13075-016-1068-0.

12) Anexos

Anexo 1

Carta de aprobación del comité de investigación














 SECRETARÍA DE SALUD		 INER INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS
<b>COMITÉ DE INVESTIGACIÓN</b>		
<i>"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"</i>		
México D. F. a 03 de Agosto de 2015 INER/CI/164/15		
Dr. Ramcés Falfán Valencia Investigador Principal		
Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN. <b>APROBACIÓN.</b>		
Título del Proyecto: IDENTIFICACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS, MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS ASOCIADOS AL RIESGO A DESARROLLAR NEUMOPATÍA INTERSTICIAL (NI) EN ARTRITIS REUMATOIDE (AR); SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA Y FARMACOGENÓMICA.		
Código asignado por el Comité: <b>B20-15</b>		
Le informamos que su proyecto de referencia ha sido evaluado por el Comité y las opiniones acerca de los documentos presentados se encuentran a continuación:		
	Nº y/o Fecha Versión	Decisión
Protocolo	Versión 1, Junio 2015	APROBADO
Carta de Consentimiento Informado	Versión 1, Junio 2015	APROBADO
Este protocolo tiene vigencia de agosto 2015 a agosto 2017.		
En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso al menos 30 días antes de la fecha de término de su vigencia. El Comité dispone en su página electrónica de un formato estándar que podrá usarse al efecto. Lo anterior forma parte de las obligaciones del Investigador las cuales vienen descritas al reverso de esta hoja.		
Atentamente		
		
Dr. Joaquín Zúñiga Ramos Presidente del Comité		

# Carta de aprobación del comité de ética en investigación

 <b>SALUD</b> SECRETARÍA DE SALUD		 <b>INER</b> INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS
<b>COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN</b>		
<i>"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"</i>		
México D. F. a 03 de Agosto de 2015 INER/CEI/228/15		
Dr. Ramcés Falfán Valencia Investigador Principal		
Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN. <b>APROBACIÓN.</b>		
Título del Proyecto: IDENTIFICACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS, MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS ASOCIADOS AL RIESGO A DESARROLLAR NEUMOPATÍA INTERSTICIAL (NI) EN ARTRITIS REUMATOIDE (AR); SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA Y FARMACOGENÓMICA.		
Código asignado por el Comité: <b>B20-15</b>		
Le informamos que su proyecto de referencia ha sido evaluado por el Comité y las opiniones acerca de los documentos presentados se encuentran a continuación:		
	Nº y/o Fecha Versión	Decisión
Protocolo	Versión 1, Junio 2015	APROBADO
Carta de Consentimiento Informado	Versión 1, Junio 2015	APROBADO
Este protocolo tiene vigencia de agosto 2015 a agosto 2017.		
En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso al menos 30 días antes de la fecha de término de su vigencia. El Comité dispone en su página electrónica de un formato estándar que podrá usarse al efecto. Lo anterior forma parte de las obligaciones del Investigador las cuales vienen descritas al reverso de esta hoja.		
Atentamente		
		
Dra. Rocio Chapela Mendoza Presidente del Comité		



# Carta del Comité de Bioseguridad

 SECRETARÍA DE SALUD		 INER INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ISMAEL COSÍO VILLEGAS											
"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"													
México D.F., a 9 de noviembre del 2015 DI/CSB/PI/24/15													
Estimado Dr. Ramcés Falfán Valencia <b>Asunto:</b> Dictamen del Comité de Bioseguridad APROBADO													
Título del proyecto: "Identificación de factores genéticos, moleculares y bioquímicos asociados al riesgo a desarrollar Neumopatía Intersticial (NI) en artritis reumatoide (AR); susceptibilidad genética y farmacogenómica." FOLIO: 2415													
Le informamos que su proyecto ha sido evaluado por este Comité y se ha encontrado que cumple con los requerimientos básicos para llevarse a cabo de manera segura en sus instalaciones. Es fundamental que durante el desarrollo de este proyecto, se de puntual cumplimiento a lo estipulado en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud Título Cuarto Capítulo I. La disposición final de los RPBI y CRETIS procedentes de las técnicas utilizadas en el proyecto deberá realizarse de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL- SSA-1-2002, Protección Ambiental, Salud Ambiental, Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos-Clasificación y especificación de manejo, que se generan en establecimientos que presentan atención médica, coordinado para su efecto por la SEMARNAT.													
Atentamente 													
QFB. Ma. del Carmen Sarabia León Presidente del Comité de Bioseguridad Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.													
<table border="1"><tr><td></td><td>INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS "ISMAEL COSÍO VILLEGAS"</td></tr><tr><td></td><td style="text-align: center;">9 NOV 2015</td><td></td></tr><tr><td colspan="3" style="text-align: center;">COMITÉ DE BIOSEGURIDAD</td></tr><tr><td>RECIBÍO:</td><td colspan="2">HORA:</td></tr></table>				INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS "ISMAEL COSÍO VILLEGAS"		9 NOV 2015		COMITÉ DE BIOSEGURIDAD			RECIBÍO:	HORA:	
	INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS "ISMAEL COSÍO VILLEGAS"												
	9 NOV 2015												
COMITÉ DE BIOSEGURIDAD													
RECIBÍO:	HORA:												

## Cartas de renovación:

**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD

ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

**INER**  
INSTITUTO NACIONAL  
DE ENFERMEDADES  
RESPIRATORIAS  
ISMAEL COSÍO VILLEGAS

"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

*Comité de Ética en Investigación*

Ciudad de México a 06 de Julio de 2017  
INER/CEI/246/17

Dr. Ramcés Falfán Valencia  
Investigador Responsable

*Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN.  
1RA. RENOVACIÓN DE APROBACIÓN.*

Título del Proyecto: IDENTIFICACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS, MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS ASOCIADOS AL RIESGO A DESARROLLAR NEUMOPATÍA INTERSTICIAL (NI) EN ARTRITIS REUMATOIDE (AR); SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA Y FARMACOGENÓMICA.

Código asignado por el Comité: **B20-15**

Respecto a su solicitud y de acuerdo a su reporte de progreso del proyecto citado, se renueva la vigencia a partir de agosto 2017.

Le recordamos que esta aprobación estará vigente de agosto 2017 a agosto 2018.

En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso al menos 30 días antes de la fecha de caducidad anterior. El Comité dispone en su página electrónica de un formato estándar que podrá usarse al efecto. Lo anterior forma parte de las obligaciones del Investigador las cuales vienen descritas al reverso de esta hoja.

Atentamente



Dra. Rocío Chapela Mendoza  
Presidenta del Comité

**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD

ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

**INER**  
INSTITUTO NACIONAL  
DE ENFERMEDADES  
RESPIRATORIAS  
ISMAEL COSÍO VILLEGAS

"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"

*Comité de Investigación*

Ciudad de México a 06 de Julio de 2017  
INER/CI/198/17

Dr. Ramcés Falfán Valencia  
Investigador Responsable

*Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN.  
1RA. RENOVACIÓN DE APROBACIÓN.*

Título del Proyecto: IDENTIFICACIÓN DE FACTORES GENÉTICOS, MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS ASOCIADOS AL RIESGO A DESARROLLAR NEUMOPATÍA INTERSTICIAL (NI) EN ARTRITIS REUMATOIDE (AR); SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA Y FARMACOGENÓMICA.

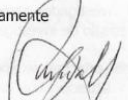
Código asignado por el Comité: **B20-15**

Respecto a su solicitud y de acuerdo a su reporte de progreso del proyecto citado, se renueva la vigencia a partir de agosto 2017.

Le recordamos que esta aprobación estará vigente de agosto 2017 a agosto 2018.

En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso al menos 30 días antes de la fecha de caducidad anterior. El Comité dispone en su página electrónica de un formato estándar que podrá usarse al efecto. Lo anterior forma parte de las obligaciones del Investigador las cuales vienen descritas al reverso de esta hoja.

Atentamente



Dra. Patricia Gorocica Rosete  
Secretaría del Comité

## Carta de consentimiento Informado

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias  
Ismael Cosío Villegas

México D. F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 201\_\_

**Consentimiento Informado**  
Protocolo: *Identificación de factores genéticos, moleculares y bioquímicos asociados al riesgo a desarrollar Neumopatía Intersticial (NI) en artritis reumatoide (AR); susceptibilidad genética y farmacogenómica.*

**Descripción del protocolo**  
El objetivo de este estudio es identificar variantes en el genoma humano que participan en la aparición, desarrollo y progresión de Neumopatía Intersticial (NI) en pacientes con Artritis Reumatoide (AR), así como el papel que juegan cada una de las posibles variantes identificadas en la población mexicana, que, dadas las características de mestizaje, no se puede comparar con otras poblaciones. Adicionalmente, se busca que la información generada por el presente protocolo, en un futuro, pueda identificar grupos poblacionales y/o individuos de alto riesgo a desarrollar NI en AR.

**Procedimiento de participación en el protocolo**  
Consiste en dos partes:  
Primera: Toma de una muestra de 14 ml. de sangre obtenida por punción en la vena del antebrazo. La cual será utilizada para la extracción del material genético (ADN) presente en las células nucleadas de la sangre, el cual, a su vez, se convierte en el material de trabajo de los procesos necesarios en la identificación de variantes del genoma que constituyen riesgo o protección a la aparición, desarrollo o progresión a formas aceleradas (de mayor gravedad) de NI en AR. Las muestras de ADN procedentes de su sangre se manejan con claves de identificación, con la finalidad de resguardar la información relacionada a su persona.  
Segunda: Recolección de datos en un formato escrito, en donde le solicitamos responder a un cuestionario con información acerca de sus antecedentes médicos, estado de salud, residencia actual y previa de hasta 2 generaciones anteriores a usted.

**Riesgos probables**  
En la toma de muestra sanguínea (venopunción) puede sentir molestia a la punción con la aguja, un ligero sangrado, y equimosis (aparición de un moretón). La muestra de sangre es tomada por personal capacitado para tal fin, lo que disminuye estos riesgos probables. Adicionalmente existe disponibilidad de tratamiento médico para el procedimiento de toma de muestra e indemnización a que legalmente tendría derecho, por parte de la institución, en el caso de daños que la ameriten, directamente causados por la venopunción y que si existen gastos adicionales, éstos serán absorbidos por el presupuesto de la investigación.

**Aceptación de participación en el protocolo**  
Al aceptar participar en el presente protocolo, después de haber leído y pensado su decisión, usted está confirmando las siguientes aseveraciones:  
**Acepto de manera voluntaria** donar esta muestra de sangre para todos los estudios genéticos que corresponden a este protocolo y recibiré una copia de este formato de mi consentimiento informado para mi registro personal.  
Entiendo que de la muestra de sangre extraerán el material genético para realizar estudios sobre diferentes genes que pueden ocasionar NI en AR; además se me ha explicado que las muestras obtenidas serán almacenadas de manera segura y en condiciones óptimas para su preservación en un área especial dentro del laboratorio de HLA del INER.  
Se me ha explicado a cerca de las complicaciones que puedo llegar a presentar como consecuencia de la punción.

Sello de autorización Comité de Ciencia y Bioética en Investigación, INER Laboratorio de HLA, Comité de Ética en Investigación, 03 AGO. 2015, APROBADO.

Pag. 1 de 2  
*Identificación de factores genéticos, moleculares y bioquímicos asociados al riesgo a desarrollar Neumopatía Intersticial (NI) en artritis reumatoide (AR); susceptibilidad genética y farmacogenómica.*

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias  
Ismael Cosío Villegas

Estoy satisfecho con la información que se me ha proporcionado y mis preguntas han sido contestadas satisfactoriamente.  
He leído y me han explicado claramente en qué consiste esta forma de consentimiento informado con respecto al uso de mi muestra de sangre en el presente protocolo de investigación.  
Entiendo mis derechos y requerimientos y sé que por lo tanto si decido no participar lo puedo hacer sin necesidad de justificar mi decisión y sin que por este motivo se vea alterado mi trato como paciente.  
Entiendo que estos estudios son realizados con fines de investigación y no ofrecen mejoría en el tratamiento.  
Estoy de acuerdo que mi identidad permanecerá anónima en caso de que mi historial médico sea revisado por personas ajenas a estos estudios de investigación.  
Entiendo que al firmar esta forma de consentimiento no estoy cediendo ninguno de mis derechos legales, también entiendo que nada en este consentimiento intenta cambiar ninguna ley aplicable en relación a los consentimientos informados.  
De igual manera, al donar mi muestra de sangre esta puede ser usada para otros estudios relacionados a enfermedades respiratorias y/o como control de referencia (creación de un banco de muestras). Si \_\_\_ No \_\_\_

Nombre del participante	Firma	Fecha (Día/Mes/Año)
Nombre del Testigo 1/Relación o Parentesco	Firma	Fecha (Día/Mes/Año)
Nombre del Testigo 2/Relación o Parentesco	Firma	Fecha (Día/Mes/Año)

**Compromiso del Investigador:**  
Certifico que de acuerdo a lo mejor de mis conocimientos, el paciente (o su representante legal) que firmó este consentimiento recibió una explicación clara, completa y detallada de las investigaciones que se realizarán con su muestra de sangre y ha tenido oportunidad de preguntar libremente cualquier duda respecto a la naturaleza, riesgos y beneficios de su participación en este protocolo de investigación, así como una copia del presente consentimiento informado.  
Este formato de consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la salud. Todos los conceptos plasmados en la declaración de Helsinki se han cumplido.

Investigador responsable: **Dr. Rameés Falfán-Valencia**  
Contacto: Laboratorio de HLA, 5487 1700 ext. 5152; Para preguntas, dudas y problemas relacionados a su participación con la Dra. Rocío Chapela M. Presidenta del Comité de Bioética en Investigación del INER: 5487 1700 exts. 5254 y 5110.

Firma del Investigador:

Fecha (Día/Mes/Año): \_\_\_\_\_

Sello de autorización Comité de Ciencia y Bioética en Investigación, INER Laboratorio de HLA, Comité de Ética en Investigación, 03 AGO. 2015, APROBADO.

Pag. 2 de 2  
*Identificación de factores genéticos, moleculares y bioquímicos asociados al riesgo a desarrollar Neumopatía Intersticial (NI) en artritis reumatoide (AR); susceptibilidad genética y farmacogenómica.*

Informe de confidencialidad de datos personales

	<b>INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS</b> <i>ISMAEL COSÍO VILLEGAS</i>	
<b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN</b>		
<b>INFORME AL TITULAR DE SUS DATOS PERSONALES</b>		
<p>Los datos personales serán protegidos, incorporados y tratados en el sistema de datos personales denominado BASES DE DATOS DE LOS PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN, con fundamento en Ley General de Salud en Materia de Investigación, Decreto INER 04-08-88, Ley General D.O.F. 7-II-1984. Ref. D.O.F. 27-V-1987, 23-XII-1987, 14-IV-1991, 7-V-1997, F.E. D.O.F. 6-IX-1984, 23-VII-1986, 18-11-1988, 12-VII-1991; Adiciones D.O.F. 21-X-1988, 24-X-1994, 26-VII-1995, 9-VII-1996; Ley de los Institutos Nacionales de Salud D.O.F. 26-V-2000, cuya finalidad es concentrar la información necesaria para el desarrollo del proyecto de investigación, para lo cual fue reclutado el paciente, fue registrado en el sistema de datos personales ante el Instituto Federal de Acceso a la Información Pública, IFAI (<a href="http://www.ifai.org.mx">www.ifai.org.mx</a>). La unidad administrativa responsable del sistema de datos personales es el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Dirección de Investigación, Dirección Médica e Investigadores, la dirección donde el interesado podrá ejercer los derechos de acceso y corrección ante la misma es la Unidad de Enlace del INER, ubicada en Calzada de Tlalpan 4502. Col. Sección XVI. Delegación Tlalpan.</p> <p>Lo anterior se informa en cumplimiento del Decimoséptimo de los Lineamientos de Protección de Datos Personales, publicados en el Diario Oficial de la Federación del 30 de septiembre de 2005.</p>		
ENTREGA PERSONAL ADMINISTRATIVO INER, NOMBRE: _____		
RECIBE PACIENTE O FAMILIAR DEL PACIENTE, NOMBRE: _____		
FIRMA: _____		
FECHA: ____ / ____ / ____		
INER DI-01 (05-2009)		



# Consentimiento bajo información de investigación

Consentimiento Bajo Información. Documento de 1 hoja, 2 páginas.  
Comité de Evaluación del Expediente Clínico. Marzo 2012

Comité de Ética en Investigación  
03 AGO. 2015

**INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS**  
**"ISMAEL COSÍO VILLEGAS"**

**APROBADO** **CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN DE INVESTIGACIÓN**  
(Autorización para acceder a estudios clínicos, de investigación o ensayos clínicos con participación de seres humanos)  
De acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en materia de prestación de servicios de atención médica, Capítulo IV. Art. 80, 81, 82 y 83.  
NOM-168-SSA-1-1998, numerales 4.2 Y 10.1

Tlalpan, México, D.F., Fecha: \_\_\_\_\_

**SECCIÓN A REGISTRAR POR EL MÉDICO/INVESTIGADOR**

Nombre completo del paciente		Fecha de nacimiento del paciente	
	Año:	Mes:	Día:

El (la) que suscribe: \_\_\_\_\_ en mi carácter de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ años de edad, manifiesto que el Dr. \_\_\_\_\_ me informó en forma verbal, sin presión alguna, de manera clara, sencilla y completa sobre mi participación en el protocolo de investigación: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ me han explicado las alternativas que quizá me sean de ayuda, procedimientos a seguir para la atención y la forma de acceso a estudios, investigaciones o ensayos clínicos relevantes para las necesidades de tratamiento, así como la posibilidad de rehusarme a participar o dejar de participar, sin que mi acceso a los servicios del INER se encuentren comprometidos por esta decisión, por lo que libremente acepto mi participación. Así mismo se me explicaron los riesgos y posibles complicaciones de mi participación, y estoy enterado (a) de que cualquier procedimiento o la administración de medicamentos representan riesgos de complicaciones, pero que el beneficio de dichos procedimientos redundará en un diagnóstico y tratamiento adecuado de mi padecimiento o de la población en general.

Acepto los riesgos mencionados en razón de ser mayor el beneficio esperado. Por consiguiente, en pleno uso de mis facultades y de acuerdo al contenido del presente documento, autorizo al equipo de salud del INER, a integrarme en el protocolo de estudio antes señalado, en el cual el Dr. \_\_\_\_\_ funge como investigador responsable y puede ser localizado en los teléfono 54 87 17 00 extensión \_\_\_\_\_ o al celular \_\_\_\_\_, en caso de una emergencia.

**SECCIÓN DE FIRMA DEL PACIENTE, FAMILIAR, RESPONSABLE O REPRESENTANTE LEGAL DEL PACIENTE O PERSONA QUE FIRMA**

Nombre completo: \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

Identificación: \_\_\_\_\_ Parentesco: \_\_\_\_\_

Firma y/o huella digital

En caso de cambiar de opinión, podrá ser revocado el consentimiento en cualquier momento.

<p><b>TESTIGO</b></p> <p>Nombre _____</p> <p>Domicilio _____</p> <p>Identificación _____ Parentesco: _____</p> <p style="text-align: center;">Firma y/o huella digital</p>	<p><b>TESTIGO</b></p> <p>Nombre _____</p> <p>Domicilio _____</p> <p>Identificación _____ Parentesco: _____</p> <p style="text-align: center;">Firma y/o huella digital</p>
--	--

En caso de que el paciente, persona responsable o tutor legal del mismo no sepan leer o escribir, deberán plasmar su huella digital.

**INVESTIGADOR RESPONSABLE**

Nombre completo: \_\_\_\_\_

Firma

**Calzada de Tlalpan 4502, Col. Sección XVI, C.P. 14080, México, D.F. Teléfono 54.87.17.00**

LICENCIA SANITARIA  
No. 1014024666

LA FIRMA DEL FAMILIAR O RESPONSABLE DEL PACIENTE SERÁ CONFORME A LOS ARTÍCULOS 80 Y 81 DEL REGLAMENTO DE LA LEY GENERAL DE SALUD EN MATERIA DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS DE ATENCIÓN MÉDICA.

INER CEECL-02 (03.2012)

## Anexo 2

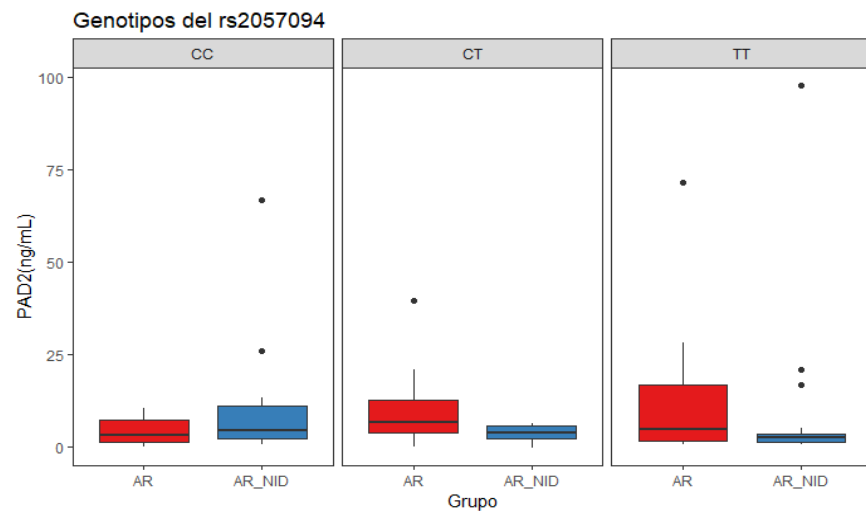


Figura 37: PAD2 en genotipos del rs2057094 en los grupos AR-NID y AR