



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS**  
**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

---

---

**Polimorfismos y haplotipos en el gen *PADI2* y su relación con la diversificación clínica en pacientes con artritis reumatoide del sur de México.**

**TE S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**P R E S E N T A:**

B.E. Claudia Isabel Ramírez Vélez

**DIRECTORA DE TESIS:**

Dra. en C. Iris Paola Guzmán Guzmán.

**ASESOR EXTERNO:**

Dr. en C. Ramcés Falfán Valencia

**Chilpancingo, Guerrero, diciembre de 2020.**




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS


ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 02 días del mes de julio de dos mil veinte, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Polimorfismos y haplotipos en el gen *PADI2* y su relación con la diversificación clínica en pacientes con artritis reumatoide del sur de México", presentada por la alumna Claudia Isabel Ramírez Vélez, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

  
Dra. Iris Paola Guzmán Guzmán  
Dirección de tesis

  
Dra. Mónica Ramírez Ruano


  
Dra. Isela Parra Rojas

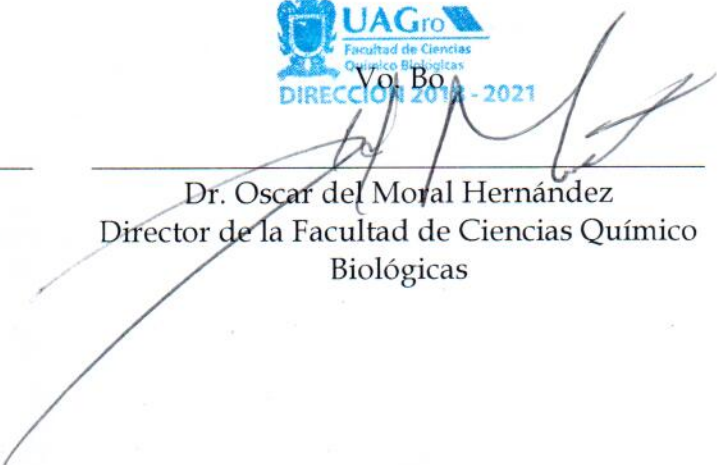
  
Dra. Natividad Castro Alarcón

  
Dr. Ramcés Falfán Valencia

Vo. Bo

  
Vo. Bo  
DIRECCIÓN 2018 - 2021

  
Dr. Oscar del Moral Hernández Sotelo  
Coordinador de la Maestría en Ciencias Biomédicas  
DIRECCIÓN 2018 - 2021

  
Dr. Oscar del Moral Hernández  
Director de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes de la Unidad Académica de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero, en colaboración con el Laboratorio de HLA perteneciente al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) Ismael Cosío Villegas, Ciudad de México.

Bajo la Dirección de:

Dra. en C. Iris Paola Guzmán Guzmán.

Asesor externo:

Dr. en C. Ramcés Falfán Valencia.

Sinodales:

Dra. en C. Isela Parra Rojas.

Dra. en C. Mónica Ramírez Ruano.

Dra. en C. Natividad Castro Alarcón.

En el periodo que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la B.E. Claudia Isabel Ramírez Vélez (CVU: 923221) fue beneficiada con la beca del CONACYT.

## **Agradecimientos**

A mi directora de tesis **Dra. en C. Iris Paola Guzmán Guzmán** por sus enseñanzas, su paciencia, su tiempo y dedicación a lo largo de este trabajo. Gracias por confiar en mí y poner todas las herramientas necesarias para culminar esta meta.

A mi asesor externo **Dr. en C. Ramcés Falfán Valencia** por todo su apoyo y paciencia en la realización de este trabajo. Pero sobre todo gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, brindarme las herramientas y sugerencias que contribuyeron al enriquecimiento del trabajo.

A mis sinodales **Dra. en C. Isela Parra Rojas, Dra. en C. Mónica Ramírez Ruano y Dra. en C. Natividad Castro Alarcón** por su apoyo, por su tiempo y por sus valiosas aportaciones para la realización de esta tesis.

Gracias a mis compañeros de trabajo, al **M. en C.B. Oscar Zaragoza García** por sus enseñanzas y apoyo en este trabajo.

## Dedicatorias

A mis padres **Leonarda Vélez Castorena** y **Faustino Ramírez Vázquez** por apoyarme en todas mis metas, por darme la confianza y nunca dejar de creer en mí , soy la persona más afortunada del mundo al tenerlos como mis padres, los amo.

A mis hermanas, **Cinthia Vélez Castorena** ,**Heliana Ramírez Vélez** y **Grecia Ramírez Vélez**, por todo su apoyo y por sus momentos divertidos a lo largo de este camino, son las mejores hermanas.

A la familia **Ramos-Alarcón** por ser unos estupendos amigos, por literalmente acompañarme estos dos años de la maestría, apoyarme y darme buenos momentos.

***Polimorfismos y haplotipos en el gen PADI2 y su relación con la diversificación clínica en pacientes con artritis reumatoide del sur de México.***

## Índice

Contenido	Páginas
I. Resumen .....	7
II. Abstract.....	8
III. Introducción.....	9
IV. Materiales y métodos .....	12
V. Resultados .....	16
VI. Discusión y conclusión. ....	24
VII. Anexos .....	28
VIII. Referencias .....	30

## I. Resumen

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad progresiva autoinmune que afecta principalmente las articulaciones sinoviales, se caracteriza por la presencia de inflamación, dolor y limitación de la función articular. El proceso de citrulinación es mediado por enzimas de la familia peptidil arginina deiminasa (PADI) y es considerado el principal desencadenante de la autoinmunidad en AR. Los niveles de PADI2 correlacionan con incremento en la actividad clínica de la AR y con los niveles elevados de anti péptidos cíclicos citrulinados (anti-CCP), sugiriendo que polimorfismos en el gen *PADI2* podrían estar asociados con el proceso de citrulinación, el patrón serológico y el proceso patológico de la AR. El objetivo de este estudio fue evaluar la asociación entre los polimorfismos rs2235926, rs2057094 y rs1005753 en el gen *PADI2* con la variabilidad clínica de la AR en pacientes del sur de México.

**Métodos:** Se llevó a cabo un estudio transversal en pacientes con diagnóstico de AR. Los polimorfismos rs2235926, rs2057094 y rs1005753 del gen *PADI2* fueron genotipificados por PCR en tiempo real utilizando sondas Taqman®. Un médico especialista en reumatología evaluó las características clínicas de los pacientes y los niveles de autoanticuerpos como factor reumatoide (FR), anti-CCP y anti-vimentina (anti-MCV) se determinaron por inmunonefelometría y ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA). El análisis estadístico se realizó utilizando el software STATA versión 14 y la estimación de los haplotipos en el programa SHEsis.

**Resultados:** Los pacientes con AR portadores del alelo T del rs2235926, rs2057094 y rs1005753 del gen *PADI2*, presentan niveles más elevados de ACPA y FR, en comparación con los no portadores. El genotipo TT del rs2235926 está asociado con niveles elevados de FR ( $p=0.03$ ). El haplotipo TTT del gen *PADI2* están relacionado con un incremento en el índice radiológico ( $p=0.001$ ).

**Conclusión:** Los polimorfismos y haplotipos en el gen *PADI2* se asocian con características serológicas de progresión y pronóstico clínico en pacientes con AR del sur de México.

**Palabras clave:** Artritis reumatoide, polimorfismos, *PADI2*, autoanticuerpos.



## II. Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a progressive autoimmune disease characterized by inflammation, pain, and joint limitation. The citrullination is a process mediated by peptidyl arginine deiminase (PADI) enzymes and is recognized as the main trigger for RA's autoimmunity. The levels of PADI2 have been correlated with elevated clinical activity and anti-CCP levels in RA. Polymorphisms in the *PADI2* gene could be associated with the citrullination level, the serological pattern, and RA's pathological process. This study's objective was to evaluate the association between the rs2235926, rs2057094 and rs1005753 polymorphisms in the *PADI2* gene with RA's clinical variability in patients from southern Mexico.

**Methods:** A cross-sectional study was carried out. The rs2057094, rs2235926 and rs1005753 polymorphisms of the *PADI2* gene were genotyped by TaqMan real-time PCR assay. A rheumatology specialist evaluated the patient's clinical characteristic and autoantibodies levels (rheumatoid factor, anti-CCP and anti-vimentin) were determined by immunonephelometry and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Statistical analysis was performed using STATA version 14 software and haplotype estimation in the SHEsis program.

**Results:** Allele T carriers of rs2235926, rs2057094 and rs1005753 in the *PADI2* gene, present higher levels of ACPA and RF, compared to non-carriers. The TT genotype of rs2235926 is related to high levels of RF ( $p = 0.03$ ). Carriages of the TTT haplotype had an increased risk to present high radiological index ( $p = 0.001$ ).

**Conclusion:** The polymorphisms and haplotypes in the *PADI2* gene are associated to serological characteristics and predictive markers of progression in RA patients from southern Mexico.

**Key words:** Rheumatoid arthritis, polymorphisms, *PADI2*, antibodies.

### III. Introducción

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune progresiva que se caracteriza por inflamación, dolor y limitación de la función articular (Smolen *et al.*, 2018). La AR tiene una prevalencia mundial de 0.5% y en México varía de 0.77% a 2.8% (Kurko *et al.*, 2013; Moreno-Montoya *et al.*, 2015). Entre las características clínicas de la AR se encuentra la producción de autoanticuerpos, como el factor reumatoide (FR), los anticuerpos contra proteínas citrulinadas (ACPA), entre los que se encuentran los anti péptidos cíclicos citrulinados (anti-CCP) y la anti-vimentina citrulinada mutada (anti-MCV) (Kurose *et al.*, 2017; Smolen *et al.*, 2018). La producción de los ACPA antes del inicio de la enfermedad y su asociación con la progresión radiológica, sugieren su papel en la patología de la enfermedad (Derksen *et al.*, 2017).

Los factores genéticos y ambientales se consideran importantes en la etiología de la AR. Se han identificado diversos loci genéticos asociados con la susceptibilidad a AR (Deane *et al.*, 2017), entre los que destacan los alelos del complejo principal histocompatibilidad (MHC) de clase II, como *HLA-DRB1\*01* y *HLA-DRB1\*04*, que codifican secuencias de aminoácidos que predicen proteínas del sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA) y que se denominan en conjunto el epítipo compartido (EC), una secuencia de 5 aminoácidos que se encuentra en la región de ensamble y presentación de antígenos a los linfocitos T (Gregersen *et al.*, 1987).

El proceso de citrulinación es el principal desencadenante de la autoinmunidad en AR, consiste en la conversión de residuos de arginina en residuos de citrulina, catalizada por enzimas de la familia peptidil arginina deiminasa (*PADI*), esta modificación postraduccional tiene un gran impacto en la estructura y función de la proteína, las proteínas citrulinadas pueden ser reconocidas como extrañas por el sistema inmune y desencadenar el proceso de autoinmunidad y posteriormente la generación de autoanticuerpos Sin embargo, las isoformas de *PADI* se expresan de manera diferencial entre células y tejidos, por lo que se les atribuye diferentes especificidades de sustrato y funciones fisiológicas (Vossenaar *et al.*, 2003; Aletaha & Smolen, 2018).

De la familia *PADI*, *PADI4* ha sido identificado en diferentes poblaciones como un gen de susceptibilidad para AR, los polimorfismos *PADI4\_89*, *PADI\_90*, *PADI\_92* y *PADI\_89*, *PADI\_90* y *PADI\_104* han sido reportados en población coreana, en población china (Kang *et al.*, 2006; Fan *et al.*, 2008; Bang *et al.*, 2010) y mexicana (Baños-Hernández *et al.*, 2017; Guzmán-Guzmán *et al.*, 2015), respectivamente.

Por otro lado, se ha reportado el aumento en la expresión de *PADI2* en tejidos sinoviales de AR, sugiriendo que también desempeña un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad. Por su parte, la proteína *PADI2* es intracelular y las proteínas citrulinadas en la membrana sinovial se han asociado con los niveles de anti-CCP (De Rycke *et al.*, 2005). Se ha demostrado que los niveles de expresión de *PADI2* y *PADI4* en el tejido sinovial de pacientes con AR se correlacionan con marcadores de inflamación como la velocidad de sedimentación globular (VSG) (Foulquier *et al.*, 2007). Y que incluso que los niveles de *PADI2* en líquido sinovial de pacientes con AR se correlacionan con la actividad clínica de la enfermedad y con los niveles séricos de anti-CCP (Damgaard *et al.*, 2016).

El gen *PADI2* se localiza en el cromosoma 1 (1p36) y es un miembro de la familia *PADI* con un nivel alto de expresión en el sistema nervioso central, monocitos, macrófagos y queratinocitos, principalmente en el núcleo celular (Arandjelovic *et al.*, 2012).

En una población de China se reportó que los polimorfismos rs2235926, rs2057094 y rs2076615 en el gen *PADI2* muestran una asociación significativa con la susceptibilidad para AR. Sin embargo, estos polimorfismos no se asociaron con la positividad de anticuerpos ni con características clínicas de los pacientes (Chang *et al.*, 2013). En un metaanálisis, Too *et al.*, 2012 reportaron que la variante genética rs1005753 de *PADI2* tanto en su constitución alélica como genotípica se asociaba con la presencia de AR en población de Malasia.

Debido a que las diferencias étnico-ambientales entre poblaciones pueden determinar variaciones genéticas relacionadas con la variabilidad clínica de la AR, es importante determinar la variabilidad en la distribución alélica de los polimorfismos en *PADI2* en población de México, dado además su amplio mestizaje, a fin de determinar su papel

en la etiología y patogénesis compleja de la AR, y su valor como marcadores genéticos de susceptibilidad con la variabilidad clínica de AR en una población del sur de México. El objetivo de este estudio fue evaluar la asociación entre los polimorfismos y haplotipos de los polimorfismos rs2235926, rs2057094 y rs1005753 del gen *PADI2* y la variabilidad clínica en pacientes con artritis reumatoide del sur de México.

#### **IV. Materiales y métodos**

Se llevó a cabo un estudio transversal en el que se incluyeron muestras 211 de pacientes con AR atendidos en el Hospital General “Dr. Raymundo Abarca Alarcón” de la ciudad de Chilpancingo, Gro, México. Los pacientes con AR fueron diagnosticados por un médico reumatólogo de acuerdo con los criterios de clasificación de Colegio Americano de Reumatología (ACR) y la Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR) versión 2010. Mediante la aplicación de una encuesta fueron obtenidos los datos sociodemográficos de cada participante como antecedentes familiares, consumo de alcohol, tabaco, edad y tiempo de evolución de la enfermedad.

Todos los participantes que se incluyeron en este estudio firmaron una carta de consentimiento informado de acuerdo con los criterios y principios establecidos en la Declaración de Helsinki de 1964, revisada en el año de 2014.

#### **Valoración clínica**

La valoración clínica de los pacientes con AR fue realizada por el médico reumatólogo determinándose el número de articulaciones inflamadas y dolorosas. La actividad clínica de la enfermedad se determinó mediante el índice *DAS28 VSG* ( $DAS-28 = 0.56 * \text{recuento de articulaciones dolorosas} / 2 + 0.28 * \text{conteo de articulaciones inflamadas} / 2 + 0.7 * \ln [VSG] + 0.014 * VAS$ ). La funcionalidad articular se determinó de acuerdo con el índice *HAQ-DI*, y se determinó la escala análoga visual del dolor y salud y el índice radiológico, de acuerdo con el método de *Sharp/Van der Heijde* que evalúa erosiones e interlínea por separado. Las erosiones se estudian en 16 áreas de cada mano y en 6 de cada pie. La escala de puntuación de las erosiones abarca del 0 al 5 (Van der Heijde, 2000).

#### **Análisis de laboratorio**

De cada individuo en el estudio, se obtuvo una muestra sanguínea por punción venosa la cual fue distribuida en dos tubos Vacutainer®, uno sin anticoagulante para la obtención de suero y otro con EDTA, a partir del que se realizó la medición de la VSG por el método de Wintrobe.

Las muestras de suero se procesaron mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para cuantificar los anti-CCP (Axis-Shield Diagnostics Ltd, Dundee, Escocia, UK) y anti-MCV (ORGENTEC Diagnostika, Mainz, Alemania), siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Un valor de referencia >5 IU/mL para anti-CCP y >20 IU/mL para anti-MCV fue considerado positivo. De acuerdo con los criterios de clasificación de ACR y EULAR (2010) los niveles de ACPA y FR por arriba de 3 veces su valor de corte se consideraron niveles altos, por lo que para anti-CCP fueron >20 IU/mL, para anti-MCV >80 IU/mL y para FR >80 IU/mL. La proteína C reactiva (CRP) y el FR se cuantificaron usando kits comerciales disponibles por turbidimetría, respectivamente, utilizando un analizador de química clínica (Mindray, BS-120, Chemistry Analyzer, Shenzhen, China).

### **Genotipificación**

A partir de células polimorfonucleares de muestras de sangre periférica se realizó extracción de DNA genómico mediante la técnica de Miller modificada.

La cuantificación del DNA fue determinada por espectrofotometría (NanoDrop 2000/c; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) calculada a través de la absorbancia a 260 nm (A260) y la pureza se obtuvo mediante la relación A260/A280 y A260/A230, se consideró una concentración adecuada de la muestra mayor a 100 ng/μL y una pureza adecuada  $A260/280 = 1.8 - 2.0$  y  $A260/230$  de 1.5 - 2.2, de acuerdo con el manual de fabricante. Se almacenó en el banco de muestra a -20 °C, hasta su uso.

Los genotipos de los polimorfismos rs2235926, rs2057094 y rs1005753 en el gen *PADI2* se determinaron a través de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), utilizando sondas TaqMan®, siguiendo las indicaciones de fabricante (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) (Anexo 1).

Las secuencias de las sondas utilizadas fueron las siguientes, para el polimorfismo rs2235926: GCTGTGTTTTGTTGTGTTTC[C/T]GTTCCCTTATGTCAGGGCTAC, para

rs2057094: CTGCGTTAGTCTTCTGCAG[**C/T**]CAGGGTCCTCAGCCCCCAA y para rs1005753: TCATCCGGTGTGTCAGCACAG[**G/T**]GTCCCACCTCAGAGTCCTG.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  por muestra que contenían: 2.60  $\mu\text{L}$  de Máster Mix (Genotyping Master Mix TaqMan®), 2.60  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas, 0.07  $\mu\text{L}$  de sonda Taqman® específica para cada polimorfismo y 5  $\mu\text{L}$  de DNA (15  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), en las siguientes condiciones de amplificación: prelectura a 50 °C durante un 1 minuto, desnaturalización inicial a 95.0 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95.0 °C, con una extensión final de 1 minuto a 60 °C, en un termociclador marca Applied Biosystems™ 7300 Real-Time PCR System. Los resultados se visualizaron utilizando el software Applied Biosystems™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), en un gráfico de tipo AD (*allelic discrimination*), el gráfico de discriminación alélica representa cada muestra como un punto individual, donde el fluoróforo VIC representa al alelo 1 y el fluoróforo FAM representa al alelo 2. El gráfico AD muestra grupos de homocigotos, heterocigotos y los controles sin templado (NTC, del inglés *non-template controls*), los homocigotos para el alelo 1 se agrupan en la esquina inferior derecha, los homocigotos para el alelo 2 se ubican en la esquina superior izquierda, los heterocigotos en el centro del gráfico y los controles en la esquina inferior izquierda (Anexo 2).

### **Análisis estadístico**

La normalidad de los datos cuantitativos se determinó utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Las variables cualitativas fueron resumidas en  $n$  y proporciones (%). Las variables continuas que no se distribuyen normalmente fueron expresadas en medianas y percentiles (5 y 95). El equilibrio de Hardy-Weinberg y las comparaciones de las distribuciones de alelos y genotipos entre grupos se evaluaron con la prueba  $\chi^2$  y la prueba exacta de Fisher. Los haplotipos se construyeron utilizando el software para análisis genético SHEsis versión 4.2. Para la construcción de los gráficos se utilizó el programa GraphPad Prism versión 8. Utilizando modelos de regresión logística se estimó el riesgo a través de la razón de momios (OR, del inglés *Odds ratio*) asociado a los genotipos y haplotipos de los polimorfismos en el gen *PADI2* sobre las

características serológicas y clínicas que definen la variabilidad clínica de la AR. El análisis estadístico se realizó utilizando el software STATA versión 14.0. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado significativo.



## V. Resultados

Se evaluaron 212 pacientes con AR, en los que la mediana de edad fue de 45 años, principalmente del sexo femenino (92%) y un nivel socioeconómico bajo (78.3%), el 96.6% refirió no consumir tabaco, no obstante, el 61.1% declaró estar expuesto a humo de leña. Las características clínicas de los pacientes con AR muestran en su general una población de pacientes con actividad clínica moderada y niveles de autoanticuerpos elevados (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Características clínicas de los pacientes con AR.

<b>Variab</b> les	<b>AR(n=211)</b>
Edad (años) <sup>a</sup>	45 (24-70)
Género n (%) <sup>b</sup>	
Femenino	194 (92)
Masculino	17 (8)
Nivel socioeconómico n (%) <sup>b</sup>	
Bajo	163 (78.37)
Medio	45 (21.63)
Fuma (%) <sup>b</sup>	
No	204 (96.68)
Si	7 (3.32)
Exposición al humo de leña (%) <sup>b</sup>	
No	82 (38.86)
Si	129 (61.14)
Consumo de alcohol (%) <sup>b</sup>	
No	205 (97.16)
Si	6 (2.84)
Duración de la enfermedad (años) <sup>a</sup>	7 (1-25)
VSG mm/hr <sup>a</sup>	30 (9-55)
DAS 28 VSG (puntaje) <sup>a</sup>	3.50 (1.93-7.5)
HAQ-DI (puntaje) <sup>a</sup>	0.3 (0.0-1.52)
FR IU/mL <sup>a</sup>	183 (0-300)
Anti-CCP IU/mL <sup>a</sup>	79.3 (0.417-400)
Anti-MVC IU/mL <sup>a</sup>	81.7 (11.7-519)
CRP mg/dL <sup>a</sup>	6.9 (0.53-59.5)
Índice radiológico (puntaje) <sup>b</sup>	2 (1-4)

<sup>a</sup>Datos mostrados en mediana y rango (5-95) y <sup>b</sup> n (%). VSG: Velocidad de sedimentación globular, HAQ-DI: Health Assesment Questionare- Disability Index, DAS-28: Índice de la actividad clínica, FR: Factor reumatoide, Anti-CCP: Antipéptido citrulinado cíclico, Anti-MVC: Antivimentina citrulinada mutada, CRP: Proteína C Reactiva.

En relación con el fenotipo clínico de los pacientes con AR incluidos en este estudio, 31.8 % de la población presentó un puntaje de actividad de la enfermedad moderada de acuerdo con el DAS 28 VSG, 81.2% presentó un nivel normal de capacidad funcional de acuerdo con el puntaje HAQ-DI, 34.9% de la población presentó un índice radiológico mayor a 3 y 80% de los pacientes manifestó los síntomas clínicos de la AR en edades menor a los cuarenta años. El fenotipo clínico de los pacientes con AR se resume en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Fenotipo clínico de los pacientes con AR.

Variable	AR (n=211)
DAS 28 VSG n(%) <sup>a</sup>	
Remisión (<2.6)	42 (20.29)
Baja (≥2.6-3.2)	50 (24.15)
Moderada (≥ 3.2-5)	66 (31.88)
Alta (≥5.1)	49 (23.67)
HAQ-DI n (%) <sup>a</sup>	
Sin dificultad	169 (81.25)
Con dificultad	34 (16.35)
Con mucha dificultad	3 (1.44)
Incapaz de hacerlo	2 (0.96)
Índice radiológico n (%) <sup>a</sup>	
≤ 1	61 (32.28)
2	62 (32.80)
≥ 3	66 (34.92)
Edad de inicio de la enfermedad n (%) <sup>a</sup>	
<40	168 (80)
≥40	42 (20)

<sup>a</sup>Datos mostrados en números absolutos (n) y porcentaje (%). El valor de *p* se calculó utilizando X<sup>2</sup>. HAQ-DI: Health Assesment Questionare- Disability Index, DAS-28: Índice de la actividad clínica.

En el cuadro 3 se muestra la frecuencia de autoanticuerpos citrulinados con valores >3 VN (valor normal). 69.4% para FR, 73.4% para anti-CCP y el 49.7% para anti-MCV. En cuanto al patrón serológico de ACPA, se observó una alta prevalencia de pacientes con doble positividad a ACPA (anti-CCP + anti-MCV) (84.21%) y triple positividad a autoanticuerpos, representada por Anti-CCP + Anti-MCV + FR (72.7%).

En relación con los polimorfismos, en el cuadro 4 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs2235926, rs2057094 y rs1005753 del gen *PADI2*. El alelo T para los tres marcadores presentó una mayor frecuencia entre la población. Las tres variantes analizadas se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p>0.05$ ).

**Cuadro 4.** Frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos rs2235926, rs2057094 y rs1005753 del gen *PADI2* en la población de AR.

Gen <i>PADI2</i>	Genotipos n= 211 (%)	Alelos n= 422 (%)	HWE
rs2235926 T>C			
TT	94 (45)		
TC	95 (45)	T	$X^2=0.07$
CC	22 (10)	C	$p=0.78$
rs2057094 T>C			
TT	98 (47)		
TC	83 (39)	T	$X^2=3.10$
CC	31 (14)	C	$p=0.07$
rs1005753 T>G			
TT	117 (55)		
TG	80 (38)	T	$X^2=0.004$
GG	14 (7)	G	$p=0.94$

Datos mostrados en números absolutos y porcentajes y %. HWE= *Hardy-Weinberg Equilibrium*.

Al comparar los niveles de ACPA y FR con los genotipos de cada polimorfismo, se observó que los portadores del alelo T, genotipo TT ( $p=0.01$ ) y TC vs CC ( $p=0.01$ ) del polimorfismo rs2235926 muestran mayores niveles de anticuerpos, principalmente de FR (Figura 1, panel C).

Este comportamiento se observó también para el polimorfismo rs2057094, para el que los portadores del genotipo TT presentaron mayores niveles de anti-CCP, anti-MCV y FR, aunque sin diferencias estadísticamente significativas (Figura 2).

Mientras que los portadores del genotipo TT del polimorfismo rs1005753 presentaron marginalmente mayores niveles de anti-CCP en comparación con los portadores del genotipo GG ( $p=0.05$ ) (Figura 3A).

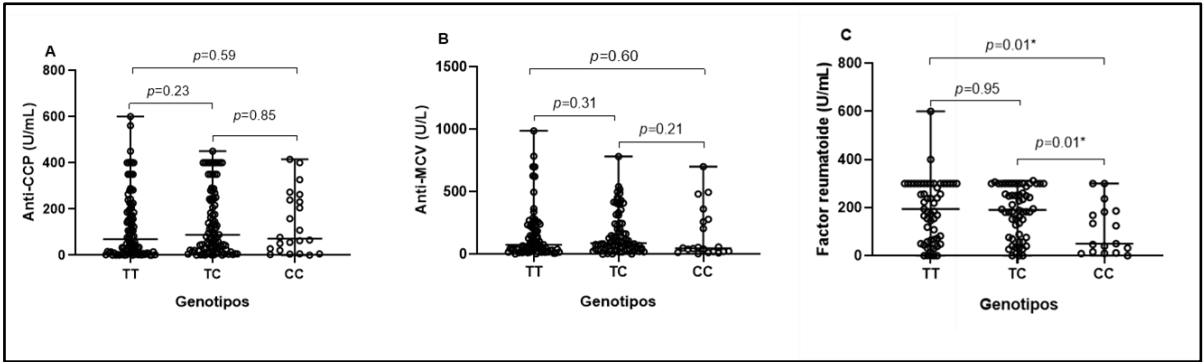


Figura 1. Relación de los niveles de ACPA y FR con los genotipos del gen *PADI2* rs2235926.

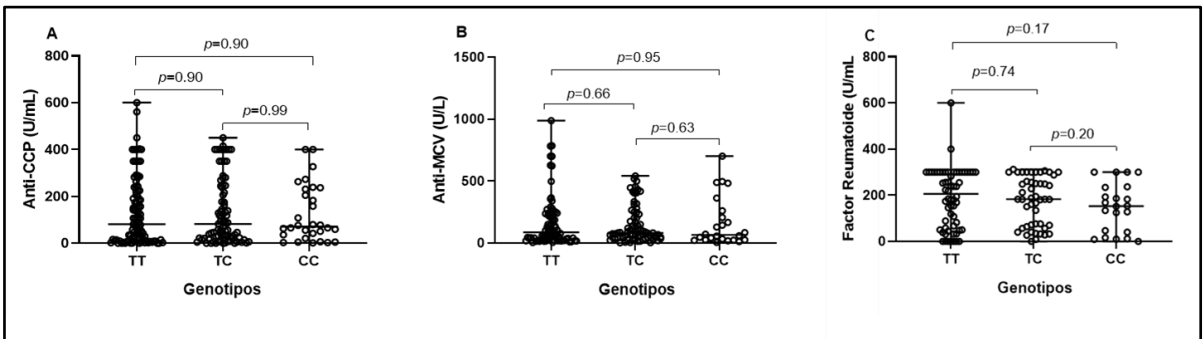


Figura 2. Relación de los niveles de ACPA y FR con los genotipos del gen *PADI2* rs2057094.

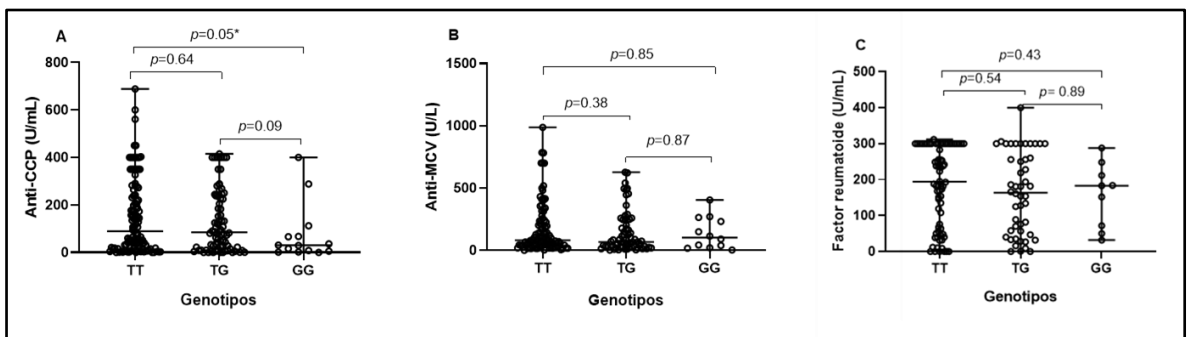


Figura 3. Relación de los niveles de ACPA y FR con los genotipos del gen *PADI2* rs1005753.

Se evaluó el fenotipo clínico y serológico de los pacientes con AR en relación con la presencia de los genotipos de los polimorfismos del gen *PADI2* rs2235926, rs2057094 y rs1005753

El genotipo TT del polimorfismo rs1005753 se asoció con un mayor índice radiológico ( $p=0.02$ ). El genotipo TT del polimorfismo rs2235926 se asoció con los niveles de FR  $\geq 80$  UI/ml ( $p=0.03$ ).

Por otra parte, la combinación alélica entre los polimorfismos estudiados permitió la identificación de 5 haplotipos diferentes en la población de AR, siendo los haplotipos TTT (49%) y CCT (21%) los más frecuentes (Cuadro 5). El análisis del equilibrio génico de ligamiento entre los polimorfismos identificó un ligamiento entre los rs2235926 y rs2057094 ( $D'/r^2= 0.86/0.70$ ) (Figura 4).

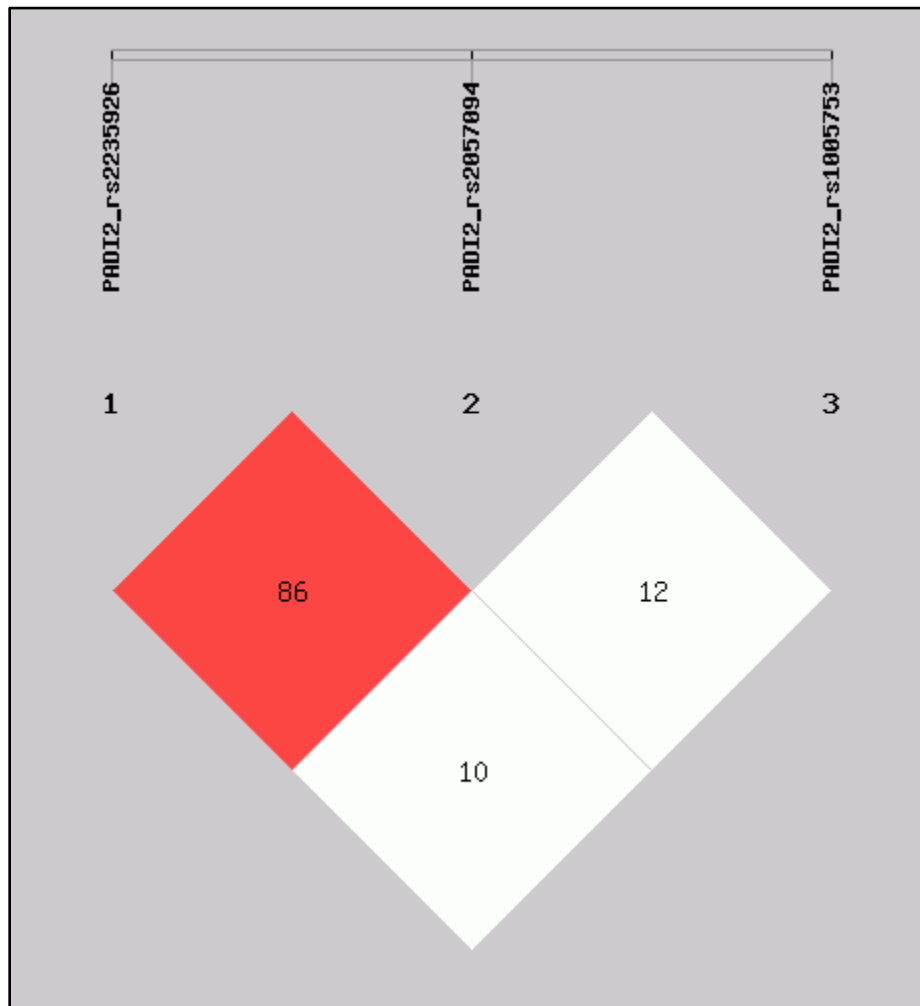
**Cuadro 5.** Distribución de haplotipos de los SNP de *PADI2* entre pacientes con AR.

2 haplotipos de SNP		3 haplotipos de SNP			AR 2n = 422 n (%)	
rs2235926-rs2057094	n (%)	D'/r2	rs2235926	rs2057094	rs1005753	
<b>T&gt;C/T&gt;C</b>			<b>T&gt;C</b>	<b>T&gt;C</b>	<b>T&gt;G</b>	
TT	262.52 (6)	0.86 (0.70)	T	T	T	208.1 (49)
CC	126.52 (30)		C	C	T	89.66 (21)
TC	17.48 (4.1)		T	T	G	57.36 (13.6)
CT	12.48 (3.0)		C	C	G	36.85 (8.7)
<b>rs2235926-1005753</b>			T	C	T	9.21 (2.2)
<b>T&gt;C/T&gt;G</b>						
TT	218 (51.7)	0.10 (0.007)				
CT	95.99 (22.7)					
TG	64.99 (15.4)					
GC	43.01 (10.2)					
<b>rs2057094-rs1005753</b>						
<b>T&gt;C/T&gt;G</b>						
TT	215.7 (51.1)	0.12 (0.010)				
CT	98.24 (23.3)					
TG	62.24 (14.7)					
CG	45.76 (10.8)					

Datos mostrados en números absolutos (n) y porcentajes (%). Coeficiente de Lewontin (D') y r2. SNP: single nucleotide polymorphism, AR: artritis reumatoide.

Los haplotipos identificados se analizaron en relación con la presencia de las características clínicas de interés a evaluar, patrón serológico y de pronóstico clínico en AR (Cuadro 6). En el análisis se identificó que el haplotipo TTT se asoció con la susceptibilidad de presentar mayor índice radiológico  $\geq 2$  ( $OR=2.07$ ,  $p=<0.001^*$ ), la evidencia muestra que la presencia del alelo T del polimorfismo rs1005753 y que se

encontró en desequilibrio del otro par de locus, confiere susceptibilidad al daño articular, ya que la presencia del alelo G (haplotipo TTG) resulta con efecto protector (OR=0.37,  $p < 0.001^*$ ).



**Figura 4. Prueba de desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos del gen *PADI2*.** Las frecuencias de haplotipos y el desequilibrio de ligamiento (LD) se calcularon utilizando el software SHEsis. Un valor de  $D' = 100$  indica un LD completo entre dos marcadores y un valor  $D'=0$  indica un nulo ligamiento. Cuanto más oscura es la celda, mayor es el desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos. *PADI2* T>C (rs2235926), T>C (rs2057094) y T>G (rs1005753), respectivamente.

**Cuadro 6.** Distribución de haplotipos y su asociación con las características clínicas de AR.

Haplotipos <sup>a</sup>	TTT	CCT	TTG	CCG
Variable	OR (IC 95%) Valor de p	OR (IC 95%) Valor de p	OR (IC 95%) Valor de p	OR (IC 95%) Valor de p
Edad de inicio de la enfermedad	1.04 (0.64-1.69)	1.82 (0.94-3.51)	0.72 (0.37-1.38)	0.61 (0.28-1.31)
≤40 años	0.85	0.20	0.32	0.20
Índice radiológico ≥2	<b>2.07</b> <b>(1.33-3.21)</b> <b>0.001*</b>	0.96 (0.57-1.60) 0.88	<b>0.37</b> <b>(0.21-0.65)</b> <b>0.001*</b>	0.96 (0.57-1.60) 0.88
DAS-28 VSG	0.94 (0.59-1.49)	1.04 (0.60-1.81)	1.01 (0.52-1.94)	0.82 (0.36-1.86)
Actividad moderada (≥3.2- 5.1)	0.80	0.86	0.97	0.63
DAS-28 VSG	0.86 (0.53-1.42)	1.07 (0.59-1.92)	0.93 (0.45-1.90)	0.99 (0.43-2.28)
Actividad alta (≥5.1)	0.57	0.81	0.85	0.98
Anti-CCP (≥20 IU/mL)	0.92 (0.51-1.67) 0.79	1.50 (0.70-3.24) 0.29	0.59 (0.27-1.28) 0.18	1.75 (0.50-6.08) 0.36
Anti-MCV (≥80 IU/mL)	0.94 (0.49-1.78) 0.85	1.53 (0.62-3.78) 0.35	0.84 (0.35-2.0) 0.71	0.74 (0.27-1.96) 0.54
FR (≥80 IU/mL)	1.87 (0.82-4.02) 0.13	0.48 (0.21-1.10) 0.07	1.35 (0.39-4.67) 0.62	1.30 (0.29-5.57) 0.72

<sup>a</sup> Los SNP se enumeran en el orden: PADI2\_rs2235926, PADI2\_rs2057094, PADI2\_rs1005753. OR: Odds Ratio; IC: Intervalos de confianza del 95%. Valores de p<0.05\* son considerados estadísticamente significativos. Modelos de regresión logística. DAS-28: Índice de la actividad clínica. FR: Factor reumatoide, Anti-CCP: Antipéptido citrulinado cíclico, Anti-MVC: Antipéptido vimentina citrulinada mutada.



## VI. Discusión y conclusión.

Los polimorfismos del gen *PADI2* fueron reportados por primera vez en un metaanálisis realizado en población filipina, posteriormente se realizó un estudio asociación en población china (Too *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2013). Sin embargo, los estudios anteriores no reportaron resultados relacionados con la positividad de anticuerpos ni con características clínicas.

En el presente estudio se encontró que los polimorfismos rs2235926, rs2057094 y rs1005753 y el haplotipo TTT del gen *PADI2* se asocian con las características clínicas de los pacientes con AR y con altos niveles de ACPA y FR en una población del sur de México.

Durante la inflamación asociada con los procesos fisiopatológicos de la AR, los estímulos proinflamatorios y el aumento de la muerte celular permiten que se produzca la citrulinación de proteínas. Estudios previos sugieren que *PADI2* y la citrulinación juegan un papel importante en el fenómeno de autoinmunidad de la AR. *PADI2* y las proteínas citrulinadas de la membrana sinovial se han asociado con niveles de anti-CCP (De Rycke *et al.*, 2005), esto podría explicar los niveles elevados de ACPA y FR en pacientes con el genotipo TT de los tres polimorfismos, hay que tener en cuenta que *PADI2* al tener una amplia expresión en diferentes tejidos y de localizarse en el citoplasma celular podría ser capaz de citrulinar proteínas tanto extracelular e intracelular, a través de procesos de inflamación y muerte celular y desencadenar el proceso de autoinmunidad (Nakayama-Hamada *et al.*, 2005; Assouhou-Luty *et al.*, 2014). En este contexto, la vimentina es una proteína de filamento intermedio y, por lo tanto, se encuentra en el citoplasma donde se expresa *PADI2*, es posible que esta isoforma de PADI sea la responsable de la producción de vimentina citrulinada y por consiguiente de los anticuerpos anti-MCV, los anticuerpos anti-MCV son miembros clave de la familia de ACPA, donde la vimentina es secretada y citrulinada al interior de los macrófagos en respuesta a la apoptosis, o por la presencia de citocinas proinflamatorias, condiciones que son altamente frecuentes en AR (Vossenar *et al.*, 2003; Hsu *et al.*, 2013).

El FR contribuye al proceso de autoinmunidad de la AR mediante un mecanismo en el que se forman grandes complejos inmunes y se induce la activación del complemento (Falkenburg *et al.*, 2015). Los resultados reportados indican que los pacientes que expresan el genotipo TT de los tres polimorfismos estudiados, tenían niveles elevados de FR, se puede especular que el FR forma inmunocomplejos con autoantígenos citrulinados por *PADI2* y que la unión de los complejos a los macrófagos sinoviales promueve la liberación de *PADI2*. Los complejos inmunes que activan el complemento también pueden mejorar la presentación de autoantígenos a las células T, que inducen la diferenciación de las células B productoras de ACPA en células plasmáticas.

Al realizar el análisis de regresión logística, los portadores del genotipo TT del polimorfismo rs1005753 presentaron el inicio de síntomas en edades menores a 40 años ( $p=0.08$ ), así como con un índice radiológico elevado ( $p=0.02$ ). De acuerdo con un estudio realizado en población coreana en 2019, se identificó como factor de riesgo en pacientes con AR el inicio de los síntomas a una edad temprana, los pacientes con un mayor número de anticuerpos asociados con la AR eran más jóvenes y presentaban una mayor duración de los síntomas (Cho *et al.*, 2019). Un aumento en el daño radiológico es atribuido al aumento de ACPA, ya que los autoanticuerpos pueden activar directamente a los osteoclastos y, por lo tanto, conducir a la formación de erosiones óseas, se ha descrito que los ACPA se unen a la superficie de los osteoclastos y promueven la diferenciación de los precursores de osteoclastos *in vitro* e *in vivo* (Derksen *et al.*, 2017). Esto podría explicar la relación de los polimorfismos de *PADI2* con los niveles de ACPA y las características clínicas.

Al evaluar el estado de los ACPA y su relación con los polimorfismos individuales de *PADI2*, se evidenció que los pacientes que eran seropositivos para los anticuerpos ACPA Anti-CCP (+)/Anti- MCV (+), la presencia del genotipo TT de los polimorfismos rs22235926, rs2057094 y rs1005753 del gen *PADI2* incrementaba el riesgo de presentar niveles elevados de ACPA, esta tendencia se observó en pacientes que presentaban un fenotipo serológico Anti-CCP (+)/Anti- MCV (+)/FR

(+). Nuestros datos reportan que la presencia de los polimorfismos en *PADI2* podrían estar relacionados con niveles elevados de ACPA y FR, e incluso de acuerdo con estudio previo, se ha encontrado que *PADI2* es capaz de citrulinar un mayor número de proteínas que *PADI4*, ya que presenta menos especificidad de sustrato en comparación con *PADI4* (Assohou-Luty *et al.*, 2014).

Con respecto al análisis de haplotipos se encontró que los haplotipos TTT y CCT eran los más frecuentes en nuestra población, representando aproximadamente el 70% de la población total. Se observó que dos polimorfismos del gen *PADI2* (rs2235926 y rs2057094), están en un fuerte desequilibrio de ligamiento para esta población ( $D' = 0.86$ ). Estos datos concuerdan con el trabajo realizado por Chang *et al.*, 2013 en pacientes con AR en población china, donde definieron un bloque que estaba compuesto por rs2235926, rs2057094 y rs2076616 en el gen *PADI2* ( $D' = 0.92$ ). La población mexicana es el resultado del mestizaje entre europeos, amerindios, asiáticos y africanos, este trasfondo genético particular podría explicar esta similitud con respecto a esta población (Moreno & Sandoval, 2013).

Al realizar el análisis de asociación de los haplotipos del gen *PADI2* con el fenotipo clínico con AR, se detectó una asociación de riesgo del haplotipo TTT con el índice radiológico, caso contrario con el haplotipo TTG que tenía una asociación de protección. Debido al LD, es posible que cualquiera de estas variantes, y la combinación de ellas sea responsable de mediar el aumento observado en la susceptibilidad a presentar características serológicas y de progresión en AR, esto refuerza la idea de un efecto funcional de los polimorfismos de *PADI2* que conduce a una mayor producción de ACPA.

Se sabe que un porcentaje muy bajo de variantes que constituyen loci de susceptibilidad a la AR afectan la secuencia de aminoácidos de los genes que codifican proteínas, como el antígeno leucocitario humano (HLA) o la proteína tirosina fosfatasa tipo 22 (PTPN22). Las variantes ubicadas dentro de la secuencia de codificación de estos genes son comunes en muchas enfermedades autoinmunes y generalmente tienen un impacto relativamente alto en la probabilidad de desarrollar AR; sin embargo, son superados en número por la gran mayoría de

los loci identificados que se encuentran en regiones no codificantes (Ding & Orozco, 2019). Los polimorfismos rsrs2235926 y rs1005753 del gen *PADI2* se encuentran localizados en el intrón 5 y el intrón 15 respectivamente, sin embargo, el polimorfismo rs2057094 se encuentra en la región 3`UTR, la gran mayoría de las variantes de susceptibilidad genética que se encuentran fuera de las secuencias de codificación, se ha sugerido que ejercen su efecto al interrumpir la función de elementos de ADN desconocidos (por ejemplo, unión de factores de transcripción) (Vaitte & Barton, 2017), incluso los efectos reguladores de los elementos no codificadores pueden influir en genes distantes (Kim *et al.*, 2017). Se necesitan más estudios epigenéticos para identificar la posible explicación de la desregulación de la unión de estos sitios, involucrados con los polimorfismos aquí mencionados.

Este trabajo representa evidencia de asociación entre los polimorfismos del gen *PADI2* y las características serológicas y clínicas en pacientes con diagnóstico de AR del sur de México. En conclusión, los polimorfismos individuales y el haplotipo TTT del gen *PADI2* se asocian con las características serológicas y de progresión radiológica que definen peor pronóstico clínico en pacientes con AR de una población del sur de México. Este estudio proporciona nuevos conocimientos sobre la genética de la AR y proporciona evidencia de que *PADI2* está involucrado no sólo con la susceptibilidad de la AR como se ha descrito en población asiática sino también con características clínicas de la enfermedad. La heterogeneidad genética entre poblaciones juega un papel importante en la susceptibilidad a la AR y la realización de estudios en diferentes poblaciones contribuye a una mejor comprensión de la etiología compleja y los factores genéticos involucrados en la AR.

Dado que la población mexicana tiene la característica de ser una población mestiza y presenta diversidad genética a través de diferentes regiones del país, es importante realizar estudios adicionales en diferentes grupos étnicos mexicanos para ampliar y comprender mejor cómo la etnia influye en la susceptibilidad de la AR y que marcadores pueden ser utilizados en la definición del pronóstico clínico de la AR.

## VII. Anexos

### Anexo 1.

#### Procedimiento para RT-PCR con sondas Taqman®

Condiciones de amplificación de PCR.			
Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Polimerización	95°C	10 minutos	1
Desnaturalización	95° C	15 segundos	
Extensión/Alineamiento	60° C	1 minuto	40

1. Limpiar el área de trabajo.
2. Preparar material y reactivos.
3. Dar vórtex vigoroso al DNA de la placa maestra (15 ng/μl) y centrifugar.
4. Tomar una alícuota de 5 ul de DNA (15 ng/μl) y depositar a la placa óptica con una pipeta multicanal.
5. Prepara la mezcla de reacción.
6. Agregar 5 μl de la mezcla de reacción, vortexear y centrifugar.
7. Verificar cada pozo sin no hay burbujas.
8. Colocar el film óptico procurando que al presionar no se toquen los pocillos.
9. Vortexear y centrifugar la placa.
10. Meter la placa al equipo Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System.
11. Seleccionar el software 7300, seleccionar "New", colocar Alelic Discrimination, el número de placa, rs, fecha y la terminación AD.
12. Agregar el rs de reacción y seleccionar la placa, ubicar los NTC (Verificar que el volumen sea 10 μl).
13. Guardar en la carpeta y exportar el documento.
14. Se realiza una prelectura y se guarda la placa.

15. Abrir nuevamente, y seleccionar Absolute Quantification y la identificación de la placa.

16. Seleccionar finish, cambiar el volumen e importar el documento, guardar la placa y dar en START. El tiempo de lectura por placa es de aproximadamente 1 hora 40 minutos.

17. Transcurrido el tiempo, abrir el archivo AD y dar Post-lectura a la placa.

18. Una vez terminado el tiempo observar los resultados

## VIII. Referencias

- Aletaha, D., & Smolen, J.** (2018). Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. *JAMA*, *320*(13), 1360-1372.
- Arandjelovic, S.,** McKenney, K., Leming, S. & Mowen, K. (2012). ATP induces protein arginine deiminase 2-dependent citrullination in mast cells through the P2X7 purinergic receptor. *J Immunol*, *189*(8), 4112-4122. doi:10.4049/jimmunol.1201098
- Assouhou-Luty, C.,** Raijmakers, R., Benckhuijsen, W., Stammen-Vogelzangs, J., de Ru, A., van Veelen, P. & Pruijn, G. (2014). The human peptidylarginine deiminases type 2 and type 4 have distinct substrate specificities. *Biochim Biophys Acta*, *1844*(4), 829-836.
- Bang, S.,** Han, T., Choi, C., Sung, Y., Bae, S. & Kang, C. (2010). 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 research & therapy*, *12*(3), R115.
- Baños-Hernández, C.,** Navarro-Zarza, J., Parra-Rojas, I., Vázquez-Villamar, M., Padilla-Gutiérrez, J., Valle, Y., *et al.* (2017). PADI4 polymorphisms and the functional haplotype are associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility: A replication study in a Southern Mexican population. *Hum Immunol*, *78*(9), 553-558.
- Chang, X.,** Xia, Y., Pan, J., Meng, Q., Zhao, Y., & Yan, X. (2013). PADI2 is significantly associated with rheumatoid arthritis. *PLoS One*, *8*(12), e81259.
- Cho, S.,** Kim, D., Won, S., Lee, J., Choi, C., Choe, J., *et al* (2019). Factors associated with time to diagnosis from symptom onset in patients with early rheumatoid arthritis. *Korean J Intern Med*, *34*(4), 910-916.
- Damgaard, D.,** Senolt, L. & Nielsen, C. (2016). Increased levels of peptidylarginine deiminase 2 in synovial fluid from anti-CCP-positive rheumatoid arthritis patients: Association with disease activity and inflammatory markers. *Rheumatology (Oxford)*, *55*(5), 918-927.
- De Rycke, L.,** Nicholas, A., Cantaert, T., Kruithof, E., Echols, J., Vandekerckhove, B., *et al* (2005). Synovial intracellular citrullinated proteins colocalizing with peptidyl arginine deiminase as pathophysiologically relevant antigenic determinants of rheumatoid arthritis-specific humoral autoimmunity. *Arthritis Rheum*, *52*(8), 2323-2330.
- Deane, K.,** Demoruelle, M., Kelmenson, L., Kuhn, K., Norris, J., & Holers, V. (2017). Genetic and environmental risk factors for rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, *31*(1), 3-18.
- Derksen, V.,** Ajeganova, S., Trouw, L., van der Helm-van Mil, A., Hafström, I., Huizinga, T., *et al* (2017). Rheumatoid arthritis phenotype at presentation differs depending on the

number of autoantibodies present. *Ann Rheum Dis*, 76(4), 716-720.

- Derksen, V.**, Huizinga, T., & van der Woude, D. (2017). The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol*, 39(4), 437-446.
- Ding, J.**, & Orozco, G. (2019). Identification of rheumatoid arthritis causal genes using functional genomics. *Scandinavian journal of immunology*, 89(5), e12753.
- Falkenburg, W.**, van Schaardenburg, D., Ooijevaar-de Heer, P., Wolbink, G. & Rispens, T. (2015). IgG Subclass specificity discriminates restricted IgM rheumatoid factor responses from more mature anti-citrullinated protein antibody-associated or isotype-switched IgA responses. *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, N.J.), 67(12), 3124–3134.
- Fan, L.**, Wang, W., Wang, Q., Zong, M., Yang, L., Zhang, H., *et al* (2008). A functional haplotype and expression of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Chinese. *Tissue Antigens*, 72(5), 469-473.
- Foulquier, C.**, Sebbag, M., Clavel, C., Chapuy-Regaud, S., Al-Badine, R., Méchin, M., *et al* (2007). Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. *Arthritis and rheumatism*, 56(11), 3541–3553.
- Gregersen, P.**, Silver, J., & Winchester, R. (1987). The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 30(11), 1205-1213.
- Guzmán-Guzmán, I.**, Reyes-Castillo, Z., Muñoz-Barrios, S., Ruiz-Noa, Y., Martínez-Bonilla, G., Parra-Rojas, I., *et al* (2015). Polymorphisms and functional haplotype in PADI4: further evidence for contribution on rheumatoid arthritis susceptibility and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in a western Mexican population. *Immunol Lett*, 163(2), 214-220.
- Hsu, P.**, Liao, Y., Lin, C., Lin, W., Liu, G., & Hung, H. (2014). Vimentin is involved in peptidylarginine deiminase 2-induced apoptosis of activated Jurkat cells. *Mol Cells*, 37(5), 426-434.
- Kang, C.**, Lee, H., Ju, H., Cho, H., Kang, C., & Bae, S. (2006). A functional haplotype of the PADI4 gene associated with increased rheumatoid arthritis susceptibility in Koreans. *Arthritis Rheum*, 54(1), 90-96.
- Kim, K.**, Bang, S., Lee, H., & Bae, S. (2017). Update on the genetic architecture of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 13(1), 13-24.
- Kurkó, J.**, Besenyei, T., Laki, J., Glant, T., Mikecz, K., & Szekanecz, Z. (2013). Genetics of rheumatoid arthritis - a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*, 45(2), 170-



- Kurose, R.**, Sawai, T., Oishi, K., Liu, X., Sasaki, A., Kurose, A., *et al* (2017). Possibility of inhibiting arthritis and joint destruction by SSEA-3 positive cells derived from synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Regen Ther*, 7, 82-88.
- Moreno-Montoya, J.**, Alvarez-Nemegyei, J., Sanin, L., Pérez-Barbosa, L., Trejo-Valdivia, B., Santana, N., *et al* (2015). Association of regional and cultural factors with the prevalence of rheumatoid arthritis in the Mexican population: a multilevel analysis. *J Clin Rheumatol*, 21(2), 57-62.
- Moreno, A.** & Sandoval, K. (2013). Diversidad genómica en México. Pasado indígena y mestizaje. *Cuicuilco*, 20 (58), 249-275. [Fecha de Consulta 1 de noviembre de 2020]. ISSN: 1405-7778. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=351/35130975013>
- Nakayama-Hamada, M.**, Suzuki, A., Kubota, K., Takazawa, T., Ohsaka, M., Kawaida, R., *et al* (2005). Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4. *Biochem Biophys Res Commun*, 327(1), 192-200.
- Smolen, J.**, Aletaha, D., Barton, A., Burmester, G., Emery, P., Firestein, G., *et al* (2018). Rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Disease primers*, 4, 18001.
- Too, C.**, Murad, S., Dhaliwal, J., Larsson, P., Jiang, X., Ding, B., *et al* (2012). Polymorphisms in peptidylarginine deiminase associate with rheumatoid arthritis in diverse Asian populations: evidence from MyEIRA study and meta-analysis. *Arthritis Res Ther*, 14(6), R250.
- Van der-Heijde D.** (2000). How to read radiographs according to the Sharp/van der Heijde method. *The Journal of rheumatology*, 27(1), 261–263.
- Viatte, S.**, & Barton, A. (2017). Genetics of rheumatoid arthritis susceptibility, severity, and treatment response. *Semin Immunopathol*, 39(4), 395-408.
- Vossenaar, E.**, Radstake, T., van der-Heijden, A., van Mansum, M., Dieteren, C., de Rooij, D. J., *et al* (2004). Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis*, 63(4), 373-381.
- Vossenaar, E.**, Zendman, A., van Venrooij, W. & Pruijn, G. J. (2003). PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features, and involvement in disease. *Bioessays*, 25(11), 1106-1118.